



HAL
open science

Plasticité morphologique des astrocytes glomérulaires du bulbe olfactif chez le rat : rôle dans la relation entre l'olfaction et la prise alimentaire

Virginie Daumas-Meyer

► To cite this version:

Virginie Daumas-Meyer. Plasticité morphologique des astrocytes glomérulaires du bulbe olfactif chez le rat : rôle dans la relation entre l'olfaction et la prise alimentaire. Alimentation et Nutrition. Université Paris Saclay (COMUE), 2017. Français. NNT : 2017SACLA019 . tel-01800054

HAL Id: tel-01800054

<https://theses.hal.science/tel-01800054>

Submitted on 25 May 2018

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

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

NNT : 2017SACLA019

THESE DE DOCTORAT
DE
L'UNIVERSITE PARIS-SACLAY
PREPAREE A AGROPARISTECH
INSTITUT DES SCIENCES ET INDUSTRIES DU VIVANT ET DE L'ENVIRONNEMENT

ECOLE DOCTORALE N°581
Agriculture, alimentation, biologie, environnement et santé (ABIES)

Spécialité de doctorat Sciences de la nutrition

Par

Mme Virginie DAUMAS-MEYER

Plasticité morphologique des astrocytes glomérulaires du bulbe olfactif chez le rat: rôle dans la relation entre l'olfaction et la prise alimentaire

Thèse présentée et soutenue à l'INRA de Jouy-en-Josas, le 30 mai 2017 :

Composition du Jury :

| | | |
|------------------------------|---|-----------------------|
| Mme Gaudichon Claire | Pr, UMR 914, INRA, AgroParisTech, Paris | Présidente |
| M. Mothet Jean-Pierre | DR, UMR 7286, CNRS, Université Aix-Marseille | Rapporteur |
| Mme Tolle Virginie | CR, UMR-S 894, INSERM, Université Paris Descartes | Rapporteur |
| M. Levy Frédéric | DR, UMR 85, INRA, Université de Tours | Examineur |
| Mme Denis Isabelle | CR, UR 1197, INRA, Jouy-en-Josas | Directrice de thèse |
| M. Congar Patrice | CR, UR 1197, INRA, Jouy-en-Josas | Co-encadrant de thèse |
| Mme Martin Claire | CR, UMR 8251, CNRS, Université Paris Diderot | Invitée |

À ma sœur Karen.

Remerciements

Ce travail de thèse a été réalisé à l'INRA de Jouy-en-Josas au sein de l'unité de NeuroBiologie de l'Olfaction (NBO) dirigée par Mme Pajot-Augy Edith.

A l'issue de ces trois années de thèse, je suis convaincue que la thèse est loin d'être un travail solitaire. En effet, je n'aurais jamais pu réaliser ce travail doctoral sans le soutien d'un grand nombre de personnes dont la générosité, la bonne humeur et le savoir-faire m'ont permis de progresser et de m'épanouir tout au long de cette merveilleuse aventure.

Je tiens tout d'abord à remercier chaleureusement Isabelle Denis et Patrice Congar, mes directeurs de thèse, qui m'ont suivie pendant mon master 2 et ma thèse. Un énorme merci à vous de m'avoir transmis votre passion pour la science, votre savoir-faire et votre expérience. Patrice, j'ai toujours pris beaucoup de plaisir à travailler et à apprendre à tes côtés. Ta patience, ta disponibilité, tes conseils et ton soutien m'ont toujours été d'une aide précieuse. Isabelle, merci de m'avoir fait confiance du premier au dernier jour. A tes côtés je me suis enrichie professionnellement et personnellement. J'admire ta passion et ton dévouement pour la recherche, ton professionnalisme et ta grande générosité aussi bien scientifiquement que humainement. Tu as la capacité d'inspirer les gens afin qu'ils donnent le meilleur d'eux-mêmes. Nos innombrables conversations me manqueront énormément. Plus qu'une collègue, tu es maintenant une amie. Merci pour ta bienveillance et ta précieuse amitié.

Merci pour votre aide dans la rédaction du manuscrit et merci de m'avoir soutenue et encouragée jusqu'au bout du bout.

Je remercie l'ensemble des membres du jury d'avoir accepté d'évaluer mon travail de thèse :

Merci à Claire Gaudichon, merci à Jean-Pierre Mothet et Virginie Tolle de me faire l'honneur d'en être les rapporteurs ; merci à Claire Martin et Frédéric Levi d'être examinateurs de ce travail de thèse.

Je remercie également chaleureusement les membres de mon comité de suivi de thèse :

Merci à Jean Gascuel, Odile Viltart, Cécile Viollet et Claire-Marie Vacher. Merci pour votre soutien et vos précieux conseils.

Je remercie tous les membres de l'unité NBO :

J'ai eu la chance de travailler dans un environnement agréable avec des gens passionnants et passionnés. Un grand merci pour votre accueil et votre aide.

Je remercie très chaleureusement Gaëlle Champeil-Potokar, pour m'avoir formée et presque tout appris sur ce merveilleux métier. Chaque année tu formes de nouveaux petits scientifiques et à chacun tu leur donne les clés de la réussite. Sans ton aide, ta patience et tes conseils je ne serais probablement pas la scientifique que je suis aujourd'hui. Je suis très heureuse d'avoir pu travailler à tes côtés pendant 4 ans. Plus que ton soutien dans ce travail de thèse, tu m'as aussi offert ton amitié. Absolument tout me manquera, ta gentillesse, ton écoute, ton soutien ... C'est avec énormément d'émotion que je quitte ce bureau où nous avons partagé nos joies, nos peines, nos tinytea et nos

friandises. Mes « folies douces » ne seront plus les mêmes sans toi. Merci pour tout, merci de m'avoir fait confiance professionnellement et personnellement, merci de ton amitié.

Merci à Patrice Dahirel pour avoir toujours pris soin de mes petits rats pendant ces années. Merci beaucoup pour ton aide et ton incroyable travail. Merci pour toutes les discussions que nous avons partagés et de ton éternelle bonne humeur.

Merci à Catherine Papillon pour son aide si précieuse durant toute ma thèse. Tu as été un véritable rayon de soleil et un immense soutien. Merci de m'avoir pris sous ton aile depuis ce fameux jour où je voulais manger ma petite part de pizza dans mon bureau ... Tu as toujours été à mon écoute et je t'en remercie profondément.

Merci à Edith Pajot-Augy, directrice de l'unité, de m'avoir accueillie dans son unité me permettant ainsi de réaliser ma thèse et offert l'opportunité de participer aux formations et congrès qui m'ont permis d'élargir ma culture scientifique.

Merci à l'ensemble des stagiaires qui ont participé à ce travail de thèse. Merci à Anne Dufourcq, Else Yona Berreby, Thomas Nguyen et Florence Guillain. Merci d'avoir partagé avec moi cette aventure, et de vous être autant investis sur ce projet. Ça a été un réel plaisir de travailler avec vous.

Je remercie chaleureusement Alizée Latour qui finissait sa thèse lorsque je suis arrivée dans l'unité pour mon stage de Master 2. Merci pour ta gentillesse et tes nombreux conseils.

Je remercie également le plateau d'histologie (GABI, INRA de Jouy-en-Josas) pour m'avoir donné la possibilité d'affiner mon travail de thèse grâce au scanner de lame que j'ai utilisé pour la prise d'image en fluorescence de mes nombreuses coupes de BO. Merci Abdelhak Boukadiri pour ton aide, et ton professionnalisme. Merci d'avoir pris autant de plaisir que moi à observer mes marquages fluorescents et d'avoir partagé ma passion pour les astrocytes. Ça a toujours été un plaisir de monter te voir et de discuter avec toi. Merci pour tout.

Je remercie Catherine Chaumontet et son équipe (Unité PNCA, INRA, AgroParisTech, Paris) de m'avoir formée aux expérimentations de RT-PCR. Merci pour votre accueil et votre aide.

Je remercie également Eugénie Huillet et Sylvie Bardou pour leur gentillesse et sympathie.

D'un point de vue personnel, je souhaite remercier mes amis : Bichon, Brenda, Chouquette, Pti Four, Choupie ... Merci et encore merci pour votre soutien sans faille, de m'avoir fait rire jusqu'au bout, d'avoir toujours cru en moi et d'avoir partagé cette aventure avec moi. Vous avez été pendant ces trois ans, ma bouffée d'oxygène, ma tisane tranquille de la semaine et mon verre de vin du week-end. Merci d'être à mes côtés depuis tant d'années.

Je remercie de tout cœur mes parents et mes proches :

Merci Papa et Maman pour toute votre aide durant ma longue vie d'étudiante, merci de m'avoir offert la possibilité de faire ce que j'aime, de m'avoir toujours soutenue et cru en moi, merci pour votre immense et précieux amour de toujours. Vous êtes des parents formidables.

Merci ma PatiKayenne, ma sœur d'amour, merci d'avoir toujours été là pour moi. Je te dédie cette thèse parce qu'on a toujours tout partagé ensemble, les bons comme les mauvais moments ainsi que

cette incroyable aventure. Tu as été à mes côtés à chaque instant de ces trois années de thèse et bien plus encore (et oui même les vacances ;)). On m'a souvent dit au labo que j'avais une incroyable motivation, et cette force c'est à toi que je la dois, tu as toujours su me comprendre et trouver les mots exacts pour me re-booste quand j'en avais besoin. Je ne serais pas la personne que je suis aujourd'hui sans toi... Merci

Enfin, un énorme merci à mon conjoint, ChériChou, sans qui je n'aurais jamais pu passer sereinement ces dernières années. Je t'avais dit avant de commencer cette aventure qu'il y aurait des moments difficiles surtout à la fin, tu m'as fait mentir car grâce à toi ces trois années ont été merveilleuses et inoubliables et ce jusqu'au dernier jour. Tu as vécu cette thèse à fond avec moi jusqu'au bout, tu m'as soutenue à chaque instant et plus encore. Merci de n'avoir jamais douté de moi. Merci de m'aimer pour ce que je suis et ce que j'aime.

Productions scientifiques

❖ Publication issue du travail de thèse

Virginie Dumas-Meyer et al., 2017. *Fasting induces astroglial plasticity in the olfactory bulb glomeruli of rats*. *Glia*. DOI: 10.1002/glia.23280

❖ Communications affichées

Daumas-Meyer V., Champeil-Potokar G.,Levillain M., Papillon C., Congar P., Denis I. *Interaction between olfaction and food intake: metabolic state drives changes in the astroglial deployment within the olfactory bulb glomeruli in rats*. 23ème meeting du club des cellules Gliales, Carry-le-Rouet, 2016.

Daumas-Meyer V., Champeil-Potokar G.,Levillain M., Papillon C., Congar P., Denis I. *Interaction between olfaction and food intake: metabolic state drives changes in the astroglial deployment within the olfactory bulb glomeruli in rats*. Journées thématiques société des neuroscience, Tours, 2016.

Daumas-Meyer V., Champeil-Potokar G.,Levillain M., Papillon C., Congar P., Denis I. *Interaction between olfaction and food intake: first evidence for a role of astroglial plasticity in the olfactory bulb*. 12ème colloque de la société des neurosciences, Montpellier, 2015

Daumas-Meyer V., Champeil-Potokar G.,Levillain M., Papillon C., Congar P., Denis I. *Interaction between olfaction and food intake: first evidence for a role of astroglial plasticity in the olfactory bulb*. 1st International Meeting on Astrocytes in Paris (AstroMeeting), 2014

Daumas-Meyer V., Champeil-Potokar G.,Levillain M., Papillon C., Congar P., Denis I. *Interaction between olfaction and food intake: first evidence for a role of astroglial plasticity in the olfactory bulb*. Young Researchers Symposium, DocJ INRA de jouy-en-Josas, 2014. *Prix du meilleur poster*.

❖ Communications orales

Daumas-Meyer V. *Interaction between olfaction and food intake: metabolic state drives changes in the astroglial deployment within the olfactory bulb glomeruli in rats*. Présentation “flash” du travail de thèse en 3 minutes. Journées thématiques société des neuroscience, Tours, 2016.

Daumas-Meyer V., Champeil-Potokar G.,Levillain M., Papillon C., Congar P., Denis I. *Interaction between olfaction and food intake: first evidence for a role of astroglial plasticity in the olfactory bulb*. Young Researchers Symposium, DocJ INRA de jouy-en-Josas, 2014.

Table des matières

| | |
|---|-----------|
| Lexique | 7 |
| Liste des figures | 10 |
| Avant-Propos | 17 |
| Introduction | 21 |
| I. Régulation de la prise alimentaire | 21 |
| A. La régulation homéostatique de la prise alimentaire | 23 |
| 1. Intégration centrale des signaux métaboliques : Le système hypothalamique | 23 |
| a. Centre de détection des signaux périphériques : Le noyau arqué (ARC)..... | 26 |
| b. Les neurones orexigènes hypothalamiques (figure 4) | 26 |
| c. Les neurones anorexigènes hypothalamiques (Figure 4)..... | 29 |
| 2. Signaux périphériques impliqués dans l'homéostasie énergétique | 31 |
| a. Signaux gastro-intestinaux | 31 |
| b. Signaux métaboliques | 34 |
| B. Les facteurs hédoniques dans la régulation de la prise alimentaire | 37 |
| 1. La régulation sensorielle de la prise alimentaire (Figure 6) | 37 |
| a. Les structures cérébrales impliquées dans l'élaboration de la valeur hédoniques des aliments | 37 |
| b. L'implication des propriétés organoleptiques des aliments dans la régulation de la prise alimentaire | 37 |
| c. Les facteurs impliqués dans les variations de palatabilité au cours d'un repas : La satiété sensorielle et l'alliesthésie | 38 |
| 2. La régulation olfactive de la prise alimentaire | 41 |
| a. Implication de l'olfaction dans la régulation de la prise alimentaire | 41 |
| b. Implication des dysfonctionnements olfactifs dans les perturbations de la prise alimentaire | 43 |
| II. Impact de l'état nutritionnel sur le système olfactif | 45 |

| | | |
|-------------|---|------------|
| 1. | Description des circuits neuronaux du système olfactif principal | 45 |
| 2. | Impact de l'état nutritionnel sur le système olfactif | 57 |
| a. | Influence de l'état nutritionnel sur la perception olfactive | 57 |
| b. | Impact de l'état nutritionnel sur l'activité des neurones du système olfactif | 58 |
| 3. | Rôle modulateur des peptides orexigènes et anorexigènes sur le système olfactif..... | 61 |
| a. | Impact des peptides et neuropeptides orexigènes sur le système olfactif..... | 61 |
| b. | Impact des peptides et neuropeptides anorexigènes sur le système olfactif..... | 65 |
| c. | Influence du glucose sur les circuits olfactifs | 68 |
| 4. | Impact des pathologies liées à des perturbations métaboliques sur le système olfactif.. | 69 |
| III. | Les astrocytes..... | 72 |
| 1. | Présentation générale..... | 72 |
| 2. | Les fonctions astrocytaires (figure 19) | 78 |
| 3. | La plasticité morphologique des astrocytes | 84 |
| a. | Exemples de plasticité morphologique astrocytaire au cours de réponse neuronale à des stimuli physiologiques | 85 |
| b. | Les mécanismes sous-tendant la plasticité morphologique des astrocytes | 93 |
| c. | Les conséquences de la plasticité morphologique des astrocytes sur la neurotransmission | 97 |
| 4. | Les astrocytes glomérulaires, au cœur des relations entre olfaction et prise alimentaire ? | 98 |
| a. | Les astrocytes glomérulaires | 98 |
| b. | Les astrocytes dans le contrôle de la balance énergétique | 101 |
| c. | Les astrocytes, senseurs métabolique du système olfactif ? | 104 |
| | Matériels et Méthodes..... | 107 |
| I. | Modèles | 107 |
| 1. | Modèles <i>in vivo</i> | 107 |
| a. | Animaux..... | 107 |
| b. | Présentation des modèles animaux et des traitements associés | 107 |
| 2. | Modèles <i>ex vivo</i> | 111 |
| a. | Dissection et réalisation des tranches de BO au vibratome..... | 112 |
| b. | Traitement pharmacologique des tranches de BO pour l'étude des mécanismes impliqués dans les modifications morphologiques des astrocytes glomérulaires..... | 112 |
| II. | Etude des paramètres physiologiques des modèles <i>in vivo</i>..... | 114 |

| | |
|--|------------|
| 1. Etude des variations pondérales | 114 |
| 2. Contrôle de la prise alimentaire | 115 |
| 3. Mesure de la glycémie | 115 |
| 4. Mesure de la leptinémie | 115 |
| 5. Analyse du comportement de recherche alimentaire..... | 115 |
| 6. Etude de l'expression des peptides hypothalamiques : Quantification des ARNm par réaction en chaîne par polymérase en temps réel (RT-PCR en temps réel) | 117 |
| a. Extraction des ARNm de l'hypothalamus..... | 118 |
| b. Rétrotranscription des ARNm en ADNc..... | 118 |
| c. Amplification par PCR quantitative en temps réel des ADNc..... | 118 |
| d. Quantification des ARNm d'intérêt | 119 |
| III. Caractérisation <i>in vivo</i> et <i>ex vivo</i> de la plasticité morphologique des astrocytes glomérulaires du BO de rat..... | 122 |
| 1. Prélèvement et fixation des BO | 122 |
| a. Fixation par immersion..... | 122 |
| b. Fixation par perfusion intra-cardiaque..... | 123 |
| 2. Coupes histologiques des BO au cryostat..... | 123 |
| 3. Marquage immunohistochimique (Figure 37) | 126 |
| 4. Traitements et analyses des images pour l'étude de la morphologie des astrocytes glomérulaires..... | 128 |
| a. Acquisition des images des coupes (<i>in vivo</i>) et des tranches (<i>ex vivo</i>) de BO marquées pour la GFAP et les noyaux..... | 128 |
| b. Quantification du pourcentage de l'aire GFAP au sein des glomérules (Figure 39)..... | 130 |
| c. Analyse du réseau astrocytaire au sein des glomérules | 130 |
| IV. Analyse <i>in vivo</i> et <i>ex vivo</i> de la fonctionnalité du réseau astrocytaire glomérulaire | 132 |
| 1. Analyse semi-quantitative de marqueurs protéiques astrocytaires (<i>in vivo</i>) | 132 |
| a. Prélèvements des BO et préparation des échantillons | 132 |
| b. Dosage des protéines par la méthode DC Assay | 132 |
| c. Migration et transfert..... | 134 |
| d. Hybridation et immunodétection..... | 134 |
| 2. Etude de la signalisation calcique des astrocytes glomérulaires par imagerie calcique (<i>Ex vivo</i>) | 137 |
| a. Chargement des tranches de BO en sonde calcique et en sulforhodamine G (Figure 44) | |

| | |
|--|------------|
| b. Montage expérimental et application d'agent pharmacologique | 139 |
| c. Acquisition des signaux calciques et traitements des données expérimentales | 141 |
| V. Analyses statistiques | 141 |

Résultats 143

I. Caractérisation du modèle de jeûne : Influence de la durée du jeûne sur la physiologie générale143

| | |
|--|-----|
| 1. Effet du jeûne sur le poids corporel (Figure 46) | 143 |
| 2. Effet du jeûne sur la glycémie (Figure 47) | 143 |
| 3. Effet du jeûne sur la leptinémie (Figure 48) | 146 |
| 4. Effet du jeûne sur le comportement de recherche alimentaire (Figure 49) | 146 |
| 5. Effet d'un jeûne de 17h sur l'expression des ARNm des peptides hypothalamiques impliqués dans la régulation de la prise alimentaire | 147 |

II. Effet du jeûne sur le déploiement des astrocytes du bulbe olfactif.....150

| | |
|--|-----|
| 1. Etude du recouvrement astrocytaire au sein des glomérules bulbaires en fonction de l'état nutritionnel | 150 |
| a. Analyse quantitative du déploiement astrocytaire au sein des glomérules du bulbe olfactif en fonction de l'état nutritionnel..... | 150 |
| b. Analyse qualitative du réseau astrocytaire au sein des glomérules du BO en fonction de l'état nutritionnel | 153 |
| 2. Expression protéique des principaux marqueurs astrocytaires du bulbe olfactif en fonction de l'état nutritionnel des rats..... | 156 |
| 3. Etude du recouvrement astrocytaire dans la couche plexiforme externe bulbaire en fonction de l'état nutritionnel | 158 |

III. Rôle des variations glycémiques dans le déploiement des astrocytes glomérulaires du bulbe olfactif.....161

| | |
|---|-----|
| 1. Etude <i>in vivo</i> de l'implication des variations glycémiques dans le déploiement des astrocytes glomérulaires du BO | 161 |
| a. Vérification de l'efficacité d'injection du glucose : mesure de la glycémie | 161 |
| b. Impact des injections de glucose sur l'expression de peptides hypothalamiques impliqués dans la régulation de la prise alimentaire | 163 |
| c. Rôle des variations glycémiques dans le déploiement des astrocytes glomérulaires du bulbe olfactif..... | 163 |
| 2. Etude <i>ex vivo</i> de l'implication des variations glycémiques dans le déploiement des astrocytes du bulbe olfactif | 163 |

| | |
|--|------------|
| IV. Implication des peptides régulant la prise alimentaire dans le déploiement des astrocytes du bulbe olfactif..... | 166 |
| A. Etude <i>in vivo</i> de l'implication des peptides régulant la prise alimentaire dans le déploiement des astrocytes du bulbe olfactif..... | 166 |
| 1. Impact de la ghréline (orexigène) sur le déploiement des astrocytes glomérulaires du bulbe olfactif | 166 |
| a. Vérification de l'efficacité d'injection de la ghréline : mesure de la prise alimentaire (figure 64) | 169 |
| b. Impact des injections de ghréline sur l'expression de peptides hypothalamiques impliqués dans la régulation de la prise alimentaire | 169 |
| c. Etude de l'implication de la ghréline dans le déploiement des astrocytes glomérulaires du bulbe olfactif..... | 169 |
| 2. Impact de peptides anorexigènes sur le déploiement des astrocytes glomérulaires du bulbe olfactif | 171 |
| a. Effet du PYY3-36 sur le déploiement des astrocytes glomérulaires du bulbe olfactif | 171 |
| b. Impact de la leptine sur le déploiement des astrocytes glomérulaires du bulbe olfactif | 173 |
| B. Etude <i>ex vivo</i> de l'implication des peptides régulant la prise alimentaire dans le déploiement des astrocytes du bulbe olfactif..... | 176 |
| 1. Impact des peptides orexigènes sur le déploiement des astrocytes glomérulaires du bulbe olfactif..... | 178 |
| a. Impact de la ghréline sur la plasticité morphologique des astrocytes glomérulaires du bulbe olfactif..... | 178 |
| b. Impact du NPY sur le déploiement des astrocytes glomérulaires du bulbe olfactif | 178 |
| 2. Impact des peptides anorexigènes sur le déploiement des astrocytes glomérulaires du bulbe olfactif | 181 |
| a. Impact du PYY3-36 sur le déploiement des astrocytes glomérulaires du bulbe olfactif. | 181 |
| b. Impact de la leptine sur le déploiement des astrocytes glomérulaires du bulbe olfactif | 181 |
| V. Etude du mode d'action des peptides (résultats préliminaires) | 185 |
| 1. Présence des récepteurs des peptides orexigènes et anorexigènes dans le bulbe olfactif | 185 |
| 2. Etude de l'impact des variations d'activité synaptique sur le déploiement des astrocytes glomérulaires – <i>Ex vivo</i>..... | 189 |
| a. Effet d'un inhibiteur de l'activité synaptique (TTX)..... | 189 |
| b. Impact du tACPD sur le déploiement des astrocytes glomérulaires du bulbe olfactif.... | 191 |
| VI. Etude de la signalisation calcique des astrocytes glomérulaires du bulbe olfactif (Résultats préliminaires) | 193 |

| | |
|--|------------|
| 1. Utilisation de la sulforhodamine G pour identifier les astrocytes bulbaires..... | 193 |
| 2. Impact de l'âge des rats sur le chargement en sulforhodamine G des astrocytes du bulbe olfactif..... | 196 |
| 3. Comparaison de différentes sondes calciques pour les études d'imagerie calcique au sein du bulbe olfactif..... | 199 |
| 4. Impact des transporteurs MRP1 sur la pénétration des différents agents pharmacologiques dans les cellules du bulbe olfactif | 199 |
| Discussion | 203 |
| I. Modifications du déploiement astrocytaire dans les glomérules du bulbe olfactif en fonction de l'état métabolique | 203 |
| II. Implication des variations glycémiques et des peptides régulant la prise alimentaire dans le déploiement astrocytaire | 217 |
| Conclusion et perspectives | 229 |
| Bibliographie | 235 |
| Article..... | 273 |

Lexique

A

α -MSH : Melanocyte Stimulating Hormone
(Hormone alpha stimulante des mélanocytes)

Ac : Anticorps

ACSF : Liquide Céphalo-Rachidien Artificiel

ADNc : ADN complémentaire

AgRP : Agouti Related Protein

ARC : Noyau arqué (Hypothalamus)

AQP-4 : Aquaporine 4

B

BHE : Barrière Hémato-Encéphalique

BO : Bulbe Olfactif

BSA : Albumine de Serum Bovin

C

CART: Cocaïne Amphétamine Related
Transcript

CCK: Cholécystokinine

CG : Cellule Granulaire (Bulbe olfactif)

CO: Cortex Olfactif

CPG: Cellule péri-glomérulaire

CRH : Corticotropin Releasing Hormone
(corticolibérine)

E

ELISA: Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay

EphA3/4 : Ephrine-A3/4 (Récepteur tyrosine
kinase)

F

FITC : Fluorescéine Isothiocyanate

G

GFAP : Glial Fibrillary Acidic Protein (protéine
acide des filaments gliaux)

GH : Hormone de croissance

GHS-R : Récepteur de la ghréline (Growth
Homrone Secretagogue Receptor)

GLAST : Glutamate-Aspartate Transporter
(transporteur astrocytaire du glutamate)

GLP-1 : Glucagon like peptide 1

GLT-1 : Glutamate transporter (Transporteur
astrocytaire du glutamate)

GLUT : Glucose Transporter (Transporteur du
glucose)

GS: Glutamine synthétase

H

HRP: horse radish peroxidase

I

Iba1: ionized calcium-binding adaptator
molecule 1 (marqueur microglial)

Icv : Intracérébroventriculaire

Ip: intra-péritonéale

K

KO: Knock Out

L

λ : longueur d'onde

LHA : Zone hypothalamique latérale (Hypothalamus)

M

MC-R : Récepteur des mélanocortines

mGluR: récepteur métabotrope au glutamate

MK571: Inhibiteur des transporteurs MRPs

MO: Muqueuse Olfactive

MRP: Multidrug Resistance Associated Protein

N

NDM : Noyau dorsomédian (Hypothalamus)

NMC: neurone magnocellulaire du noyau supra-optique (Hypothalamus)

NO : Neurone Olfactif

NPV: Noyau paraventriculaire (Hypothalamus)

NPY : Neuropeptide Y

NSC : Noyau Supra-Chiasmatique (hypothalamus)

NSO : Noyau Supra-Optique (Hypothalamus)

NVM : Noyau ventromédian (Hypothalamus)

O

Ob-R : Récepteur à la leptine

OGB-1 : Oregon Green BAPTA-1

OT: Ocytocine

OX A/B: Orexines A/B

OXR: Récepteur aux orexines

P

PA : Prise Alimentaire

PAP : Prolongement péri-synaptique astrocytaire

PAV : Peptide Arginine Vasopressine

PBS : Phosphate Buffer Saline (tampon phosphate salin)

PBST : PBS Triton

PCR : Polymerase chain reaction

PFA : Paraformaldéhyde

PIV : Peptide Intestinal Vasoactif

POMC : Pro-opiomélanocortine

PYY3-36: Peptide Tyrosine Tyrosine (fragment 3-36)

R

RI: Récepteur à l'insuline

RIPA : Radio-ImmunoPrecipitation Assay

ROI: Region Of Interest (region d'intérêt)

RT-PCR : Reverse transcription polymerase chain reaction

Y

Y1R : Récepteur Y1

Y2R : Récepteur Y2

S

SB : Sample Buffer

SDS : Sodium Dodécyl Sulfate (dodécylsulfate de sodium)

SEM : Ecart standard à la moyenne

Sérum Phy. : Sérum physiologique

SGLT : Co-transporteur Na⁺ du glucose

SMD : Système Méso-limbique dopaminergique et système de récompense

SNC : Système Nerveux central

SulfoG : Sulfohodamine G

T

tACPD : (1S,3R)-1-Aminocyclopentane-1,3-Dicarboxylic Acid (Agoniste des récepteurs métabotropiques de type 1 au glutamate)

TBS : Tris Buffer Saline (tampon tris salin)

TBST: TBS Triton

TIFF: Tag Image File Format

TRH: Thyrotropin Releasing Hormon

TTX: Tétrodotoxine

V

VP: Vasopressine

Liste des figures

Introduction

Figure 1: Présentation schématique des voies de régulation de la prise alimentaire. **Page 22**

Figure 2: Présentation des différents noyaux hypothalamiques impliqués dans la régulation de la prise alimentaire. **Page 24**

Figure 3: Présentation des circuits hypothalamiques impliqués dans la régulation de la prise alimentaire. **Page 25**

Figure 4: Principaux neuropeptides hypothalamiques impliqués dans la régulation de l'homéostasie énergétique. **Page 27**

Figure 5: Présentation des signaux périphériques impliqués dans la régulation de la prise alimentaire. **Page 30**

Figure 6: La régulation sensorielle de la prise alimentaire. **Page 36**

Figure 7: Introduction au principe de l'alliesthésie (*D'après Cabanac et Duclaux, 1973*). **Page 39**

Figure 8: Présentation du système olfactif des rats. **Page 46**

Figure 9: Histologie de l'épithélium olfactif. **Page 48**

Figure 10: La voie principale de transduction chimio-électrique olfactive (*D'après Mainland et al., 2014*). **Page 49**

Figure 11: Histologie du bulbe olfactif principal. **Page 51**

Figure 12: Les connexions épithélio-bulbaires. **Page 52**

Figure 13: Les cartes olfactives glomérulaires (*D'après Max L. Fletcher et al., 2009 et Khan AG et al., 2010*). **Page 53**

Figure 14: Présentation des différentes zones de projection olfactive. **Page 55**

Figure 15: Les interactions synaptiques glomérulaires. **Page 56**

Figure 16: Représentation schématique de l'expression générale des récepteurs hormonaux, peptidiques et énergétiques pour les principaux facteurs métaboliques dans le système olfactif (*D'après Palouzier-Paulignan et al., 2012*). **Page 60**

Figure 17: Dessin d'astrocytes de Ramon y Cajal, 1897. **Page 73**

Figure 18: Les prolongements péri-synaptiques astrocytaires (*D'après Reichenbach et al., 2010*) .
Page 75

Figure 19: Présentation des principales fonctions astrocytaires au niveau de la synapse glutamatergique. **Page 77**

Figure 20: Schéma simplifié du couplage neuro-métabolique entre neurones et astrocytes (*D'après Demetrius et al., 2015*) . **Page 79**

Figure 21: Régulation du flux sanguin par les astrocytes (*D'après Navarrete et Araque, 2014*). **Page 80**

Figure 22: La synapse tripartite (*Adapté de Perea G. et al., 2005*). **Page 82**

Figure 23: Présentation de la plasticité morphologique astrocytaire dans le noyau supra-optique (*D'après Théodosis et al., 2008*). **Page 86**

Figure 24: Présentation schématique des modifications de la gliotransmission dans le noyau supra-optique lors de la lactation (*D'après le livre Neurophysiology of Neuroendocrine Neurons de William E.*). **Page 88**

Figure 25: Modification du déploiement astrocytaire dans le noyau supra-chiasmatique au cours du cycle jour/nuit (*D'après Lavialle et al., 2001*). **Page 90**

Figure 26: Présentation schématique des modifications différentielles de recouvrement astrocytaire dans le noyau supra-chiasmatique au cours du cycle jour/nuit, en fonction du type neuronal (*D'après Bosler et al., 2015*). **Page 91**

Figure 27: Présentation schématique des interactions bidirectionnelles entre synapses et astrocytes dans les processus de consolidation et de renforcement des synapses (*D'après Bernardilleni et al., 2014*). **Page 96**

Figure 28: Les astrocytes glomérulaires du bulbe olfactif. **Page 99**

Materiels et Méthodes

Figure 29: Protocole de mise à jeun des rats. **Page 108**

Figure 30: Protocole d'injection de glucose et de peptides régulant la prise alimentaire. **Page 110**

Figure 31: Traitement pharmacologique des tranches de BO pour l'étude des mécanismes impliqués dans les modifications morphologiques des astrocytes glomérulaires. **Page 113**

Figure 32: Présentation des étapes de la RT-PCR quantitative en temps réel pour la quantification des ARNm. **Page 116**

Figure 33: Séquence des couples d'amorces d'oligonucléotidiques, sens et anti-sens, spécifiques des gènes étudiés. **Page 120**

Figure 34: Description des étapes d'amplification par PCR quantitative en temps réel des ADNc avec la sonde fluorescente SyberGreen. **Page 121**

Figure 35: Description du protocole de fixation par perfusion intra-cardiaque chez le rat. **Page 124**

Figure 36: Orientation des coupes histologiques de bulbe olfactif de rat et répartition des coupes sur lames. **Page 125**

Figure 37: Protocole du marquage immunohistochimique de la GFAP et du Hoechst, des coupes sur lame (in vivo) et des tranches flottantes (ex vivo). **Page 127**

Figure 38: Prises de vue des coupes de bulbe olfactif à l'objectif 20X à partir du logiciel PannoramicViewer. **Page 129**

Figure 39: Protocole de quantification du pourcentage de l'aire GFAP au sein des glomérules, par le logiciel *ImageJ*. **Page 131**

Figure 40: Description du protocole de traitement d'image par le logiciel *imageJ* pour l'analyse du réseau astrocytaire au sein des glomérules par le plugin *skeletonize* d'*imageJ*. **Page 133**

Figure 41: Principe général de l'analyse protéique par western blot. **Page 135**

Figure 42: Liste des anticorps utilisés en western blot. **Page 136**

Figure 43: Illustration de la méthode de détection des protéines d'intérêt en western blot. **Page 136**

Figure 44: Chargement des tranches de bulbe olfactif en sonde calcique et en sulforhodamine G et tableau récapitulatif des concentrations testées. **Page 138**

Figure 45: Acquisition des signaux calciques et traitements des données expérimentales. **Page 140**

Résultats

Figure 46 : Effet du jeûne sur le poids corporel des rats. **Page 144**

Figure 47 : Effet du jeûne sur la glycémie des rats. **Page 144**

Figure 48 : Effet du jeûne sur la leptinémie des rats. **Page 145**

Figure 49 : Effet du jeûne sur le comportement de recherche alimentaire. **Page 145**

Figure 50 : Effet d'un jeûne de 17h sur l'expression des ARNm du NPY (peptide orexigène) dans l'hypothalamus. **Page 148**

Figure 51 : Effet d'un jeûne de 17h sur l'expression des ARNm du CRH (peptide anorexigène) dans l'hypothalamus. **Page 148**

Figure 52 : Effet d'un jeûne de 17h sur l'expression des ARNm des peptides hypothalamiques impliqués dans la régulation de la prise alimentaire. **Page 149**

Figure 53 : Effet du jeûne sur le déploiement astrocytaire dans les glomérules du BO. **Page 151**

Figure 54 : Comparaison du déploiement astrocytaire dans les glomérules du BO en fonction de l'état nutritionnel des rats. **Page 151**

Figure 55 : Effet du jeûne sur la taille des glomérules de BO. **Page 152**

Figure 56 : Compartimentation et orientation des astrocytes dans les glomérules de BO de rat. **Page 154**

Figure 57 : Effet du jeûne de 17h sur l'architecture du réseau astrocytaire des glomérules de BO de rat. **Page 155**

Figure 58 : Effet du jeûne sur la quantité totale de GFAP dans les BO. **Page 157**

Figure 59 : Effet du jeûne sur les marqueurs de la régulation astrocytaire de la synapse glutamatergique (GLAST et GS) dans les BO. **Page 157**

Figure 60 : Effet du jeûne sur le déploiement astrocytaire dans la couche plexiforme externe du BO. **Page 159**

Figure 61 : Effet d'une injection de glucose chez des rats à jeun pendant 17h sur la glycémie. **Page 162**

Figure 62 : Effet d'une injection de glucose chez des rats à jeun 17h sur le déploiement astrocytaire dans les glomérules du BO. **Page 164**

Figure 63 : Effet d'un milieu appauvri en glucose sur le déploiement astrocytaire dans les glomérules de tranches de BO maintenues en survies. **Page 165**

Figure 64 : Effet d'une injection de ghréline (peptide orexigène) chez des rats nourris sur la prise alimentaire. **Page 167**

Figure 65 : Effet d'une injection de ghréline (peptide orexigène) chez des rats nourris sur l'expression des ARNm du NPY (peptide orexigène), MC4R et CRH (peptides anorexigènes) dans l'hypothalamus. **Page 168**

Figure 66 : Effet d'une injection de ghréline (peptide orexigène) chez des rats nourris sur le déploiement astrocytaire dans les glomérules du BO. **Page 170**

Figure 67 : Effet d'une injection de PYY3-36 (peptide anorexigène) chez des rats à jeun pendant 17h sur la prise alimentaire. **Page 172**

Figure 68 : Effet d'une injection de PYY3-36 (peptide anorexigène) chez des rats à jeun pendant 17h sur le déploiement astrocytaire dans les glomérules du BO. **Page 174**

Figure 69 : Effet d'une injection de leptine (peptide anorexigène) chez des rats à jeun pendant 17h sur la prise alimentaire. **Page 175**

Figure 70 : Effet d'une injection de leptine (peptide anorexigène) chez des rats à jeun pendant 17h sur le déploiement astrocytaire dans les glomérules du BO. **Page 177**

Figure 71 : Effet de la ghréline (peptide orexigène) sur le déploiement astrocytaire dans les glomérules de tranches de BO maintenues en survies. **Page 179**

Figure 72 : Effet du NPY (neuropeptide orexigène) sur le déploiement astrocytaire dans les glomérules de tranches de BO maintenues en survies. **Page 180**

Figure 73 : Effet du PYY3-36 (peptide anorexigène) sur le déploiement astrocytaire dans les glomérules de tranches de BO maintenues en survies. **Page 182**

Figure 74 : Effet de la leptine (peptide anorexigène) sur le déploiement astrocytaire dans les glomérules de tranches de BO maintenues en survies. **Page 183**

Figure 75 : Localisation du récepteur Y1R dans le BO de rat. **Page 186**

Figure 76 : Localisation du récepteur Y2R dans le BO de rat. **Page 187**

Figure 77 : Localisation du récepteur ObR dans le BO de rat. **Page 188**

Figure 78 : Effet d'une inhibition d'activité neuronale (TTX) sur le déploiement astrocytaire glomérulaire induit par l'action du NPY sur tranches de BO maintenues en survies. **Page 190**

Figure 79 : Effet du tACPD sur le déploiement astrocytaire glomérulaire de tranches de BO maintenues en survies. **Page 192**

Figure 80 : Mise au point des techniques d'imagerie calcique dans le BO : Comparaison du mode d'application de la sulforhodamine G (sulfoG) pour le marquage des astrocytes. **Page 194**

Figure 81 : Mise au point des techniques d'imagerie calcique dans le BO : Comparaison de deux concentrations de sulfoG (1 μ M vs 5 μ M) pour la méthode d'application direct sur tranche de BO. **Page 195**

Figure 82 : Mise au point des techniques d'imagerie calcique dans le BO : Comparaison de l'âge des rats pour l'optimisation du chargement des astrocytes en sulfoG. **Page 197**

Figure 83 : Mise au point des techniques d'imagerie calcique dans le BO : Comparaison entre le BO et le cortex, du chargement des astrocytes en sulfoG. **Page 198**

Figure 84 : Mise au point des techniques d'imagerie calcique dans le BO : Comparaison de deux sondes calciques (FURA-2 vs OREGON GREEN B-1 (OGB1)) pour l'étude de la signalisation calcique astrocytaire du BO. **Page 200**

Figure 85 : Mise au point des techniques d'imagerie calcique dans le BO : Effet de l'inhibition des transporteurs MRP1 sur la pénétration de la sulfoG et du FURA-2. **Page 202**

Discussion et Conclusion

Figure 86 : Visualisation des prolongements astrocytaires pérисynaptiques (PAPs) par le marquage de l'euline non phosphorylée. **Page 206**

Figure 87 : Représentation schématique des différentes connexions neuronales dans le bulbe olfactif (*D'après Oswald and Urban, 2012*). **Page 208**

Figure 88 : Régulation de la neurotransmission du signal olfactif par les astrocytes en fonction du statut nutritionnel des rats. **Page 210**

Figure 89 : Modulation de la neurotransmission des synapses GABAergiques et glutaminergiques par la libération de glutamine astrocytaire. **Page 212**

Figure 90 : Fonctionnalités moléculaires des différentes régions glomérulaires du bulbe olfactif (*D'après Mori et al., 2011*). **Page 216**

Figure 91 : Régulation de la sécrétion gastro-intestinale des peptides PYY3-36 et GLP-1 par activation MC4R (*D'après de Panaro et al., 2014*). **Page 220**

Figure 92 : Effet du NPY sur la plasticité morphologique d'astrocytes du BO en culture primaire (*D'après Gaëlle Champeil Potokar*). **Page 227**

Figure 93 : Effet du NPY sur la plasticité morphologique des PAPs d'astrocytes du BO en culture primaire (*D'après Gaëlle Champeil Potokar*). **Page 228**

Figure 94 : Facteurs impliqués dans les variations de déploiement astrocytaire dans les glomérules du bulbe olfactif et relations avec la régulation de la prise alimentaire. **Page 231**

AVANT-PROPOS

Avant-Propos

La perception de l'odeur de l'aliment joue un rôle important dans la prise alimentaire, en termes quantitatifs et qualitatifs. Le système olfactif participe ainsi à l'élaboration de la valeur hédonique des aliments et intervient dans la régulation de l'appétit, de la prise alimentaire et du niveau de satiété. Réciproquement, la détection des odeurs alimentaires est influencée par le statut métabolique, ce qui contribue à établir une boucle de régulation olfaction-nutrition. La valeur hédonique des stimuli olfactifs induits par un aliment est ainsi fortement diminuée chez l'individu rassasié par rapport à un individu à jeun. Les travaux précédemment réalisés au sein de notre unité ont montré quelques-unes des bases physiologiques des variations de perception olfactive en fonction de l'état métabolique. En particulier, la muqueuse olfactive (site de réception des molécules odorantes) et le bulbe olfactif (premier site d'intégration du message olfactif vers le système nerveux central), expriment un certain nombre de récepteurs des hormones et peptides régulant la prise alimentaire (insuline, leptine, orexines, NPY). La mise à jeun module les concentrations de ces hormones/peptides, et modifie l'expression génique de leurs récepteurs dans ces structures (Baly et al., 2007; Prud'homme et al., 2009). Certains de ces régulateurs de la prise alimentaire sont capables de modifier de façon aiguë le signal olfactif lors de sa genèse dans la muqueuse olfactive ou de son intégration dans le bulbe olfactif (BO) (Palouzier-Paulignan et al., 2012a). Plusieurs travaux indiquent en outre que l'olfaction et sa régulation par l'état métabolique sont altérées dans les situations d'obésité (chez l'homme et dans les modèles murins) (Fadool et al., 2011; Getchell et al., 2006; Jansen et al., 2003). Cette altération pourrait participer à la perte de contrôle de l'appétit entrant dans l'étiologie des obésités. Cependant la caractérisation de ces altérations et la mise en évidence des mécanismes sous-jacents restent largement à étudier.

Pour tenter d'avancer sur ces mécanismes, notre projet cible les interactions neurones-astrocytes au niveau du bulbe olfactif. Les neurones sensoriels provenant de la muqueuse olfactive projettent directement dans les glomérules du bulbe olfactif. Dans ces structures très plastiques, essentielles pour la transmission du signal olfactif vers les aires cérébrales plus profondes, les prolongements astrocytaires, très abondants, s'entremêlent avec les axones des neurones sensoriels et les dendrites des neurones du BO. Cette zone d'interactions constitue un site potentiel d'intégration des multiples régulations s'exerçant sur l'information olfactive (métaboliques, émotionnelles, cognitives...). Le rôle des astrocytes y est souligné par quelques travaux récents (Martin et al., 2012; Roux et al., 2011) et mérite d'être approfondi.

Les astrocytes sont aujourd'hui reconnus comme des partenaires à part entière de la synapse

(Halassa et al., 2007a) et sont considérés comme des méta-régulateurs de la neurotransmission dans le système nerveux central, notamment en coordonnant des réseaux neuronaux en réponse à des stimuli hormonaux et environnementaux (Min et al., 2012). Dans plusieurs régions cérébrales, de nombreux états physiologiques (état nutritionnel, stress, rythme circadien, âge, déshydratation, reproduction, lactation) modulent la couverture synaptique astrocytaire et son rôle dans le maintien de l'homéostasie extracellulaire et la régulation de la neurotransmission (Sykova, 2005; Theodosis et al., 2008). Il est intéressant de souligner que la méta-plasticité assurée par les astrocytes s'observe particulièrement dans les structures cérébrales intégrant des informations sensorielles pour induire les réponses physiologiques nécessaires à l'adaptation de l'organisme. La plasticité morphologique astrocytaire au cours du cycle nycthéral dans les noyaux supra-chiasmatiques (NSC) ou au cours de la lactation dans les noyaux supra-optiques (NSO) en sont deux des exemples les plus illustratifs.

Dans les glomérules du bulbe olfactif, les synapses principales sont glutamatergiques (projections des neurones olfactifs sur les cellules mitrales). Des études récentes ont montré que l'activation neuronale induit le couplage et l'activation des prolongements astrocytaires présents dans les glomérules (Roux et al., 2011). La capture du glutamate *via* les transporteurs astrocytaire GLAST semble essentielle à l'activation neuronale et aux oscillations générées dans le bulbe olfactif (Martin et al., 2012). Le déploiement astrocytaire au sein des glomérules est variable d'un glomérule à l'autre (Chao et al., 1997a), et il pourrait aussi varier en fonction du niveau d'activation des glomérules par les neurones olfactifs.

L'ensemble de ces données suggère un lien étroit entre l'activation glomérulaire (neuronale), dont la répartition spatiale varie en fonction des stimuli odorants (cartes olfactives), et la couverture synaptique astrocytaire. De plus, la présence de certains récepteurs aux peptides/hormones impliqués dans la régulation de la prise alimentaire (Leptine, NPY, etc...), au niveau des prolongements des astrocytes du bulbe olfactif plaide pour une participation active de l'astrocyte dans le lien olfaction / prise alimentaire. L'interaction neurones-astrocytes au sein des glomérules pourrait donc être un support de la régulation de la sensibilité olfactive par l'état nutritionnel.

Ainsi, l'étude des interactions neurones-astrocytes au sein du BO peut permettre de mieux appréhender les mécanismes d'intégration du signal olfactif, de caractériser ceux reliant l'olfaction et la prise alimentaire, et d'avancer sur la compréhension du rôle des astrocytes dans la régulation synaptique.

L'objectif principal de ce travail a donc été de caractériser, chez le rat, les modifications morphologiques des astrocytes glomérulaires du BO en fonction des états métaboliques/nutritionnels des animaux et/ou des peptides/hormones régulant ces états. Pour cela,

nous avons utilisé deux modèles *in vivo* : un modèle nous permettant de moduler l'état nutritionnel des rats grâce à différents temps de mise à jeun (nourris *versus* à jeun pendant 17h, 24h ou 48h) ; et un modèle d'injection de glucose ou de peptides impliqués dans la régulation de la prise alimentaire chez des rats nourris ou à jeun. Afin de préciser les résultats obtenus *in vivo* et l'implication respective des variations glycémiques ou des peptides orexigènes/anorexigènes dans les variations morphologiques des astrocytes glomérulaires du BO, nous avons utilisé un modèle *ex vivo* de tranches de BO, nous permettant d'étudier la morphologie des astrocytes glomérulaires en fonction de traitements par des facteurs caractéristiques des différents états métaboliques (modulation des apports en glucose ou peptides orexigènes/anorexigènes). Un modèle *in vitro*, de culture d'astrocytes de bulbe olfactif, est en cours de développement et viendra affiner et compléter nos résultats.

La synthèse bibliographique suivante a pour objectif de mieux comprendre les interactions neurones-astrocytes, dans le système nerveux central, puis plus spécifiquement au sein des glomérules du BO, afin de mieux cerner leur rôle potentiel dans la relation entre l'olfaction et la prise alimentaire. Nous ferons donc successivement : 1) une présentation générale de la régulation de la prise alimentaire, avant d'aborder plus spécifiquement l'implication du système olfactif dans cette régulation ; 2) une rapide présentation du système olfactif sera faite avant une description plus approfondie de l'impact de l'état nutritionnel, et des facteurs régulant cet état, sur le système olfactif ; 3) enfin une description des astrocytes et de leur plasticité morphologique, dans le système nerveux central, permettra de justifier l'intérêt de l'étude de la plasticité morphologique des astrocytes dans les glomérules du BO, pour avancer sur la compréhension des mécanismes qui relient l'olfaction et la prise alimentaire.

INTRODUCTION

Introduction

I. Régulation de la prise alimentaire

La prise alimentaire a pour but d'assurer l'apport en substrats énergétiques et en composés biochimiques nécessaires à la survie de l'organisme. Elle est régulée par un ensemble complexe de processus pour assurer l'homéostasie énergétique de l'organisme, c'est à dire l'équilibre entre les réserves énergétiques, stockées essentiellement dans les tissus adipeux, et les dépenses liées à l'activité et au métabolisme de base d'un individu.

Un épisode de prise alimentaire comprend trois phases : une phase pré-ingestive caractérisée par la sensation de faim, une phase prandiale correspondant à la période de prise alimentaire et au processus progressif de rassasiement, et une phase postprandiale caractérisée par l'état de satiété dont la durée est variable.

La régulation de la prise alimentaire est liée à des informations nerveuses sensorielles et humorales élaborées avant et pendant la prise alimentaire, puis pendant la digestion et le métabolisme des nutriments. Ces signaux régulent la quantité d'aliments ingérés en participant à l'élaboration des sensations de faim, de rassasiement et en déterminant la durée de la période de satiété, correspondant à l'intervalle entre deux prises alimentaires.

La prise de nourriture est l'aboutissement d'une séquence comportementale complexe qui résulte de l'intégration au niveau central des signaux métaboliques de faim et de satiété mais aussi des facteurs hédoniques passant notamment par les propriétés organoleptiques des aliments, telles que le goût, l'odeur et la texture. Une multitude de signaux hormonaux et nerveux sont intégrés au niveau de l'hypothalamus et du tronc cérébral pour assurer le dialogue entre l'apport en nutriments, les réserves énergétiques et le métabolisme, et maintenir ainsi l'homéostasie énergétique. La composante hédonique et motivationnelle de la prise alimentaire est encodée par des circuits neuronaux du système méso-limbique dopaminergique (SMD ; système de récompense) en lien avec les systèmes sensoriels impliqués dans l'appréciation du goût, des saveurs, de la texture, et de l'aspect des aliments ingérés. L'intégration au niveau central des signaux métaboliques et des facteurs hédoniques contribuent conjointement à maintenir l'homéostasie énergétique (Berridge et al., 2009; Berthoud, 2006; Karatsoreos et al., 2013) (Figure 1).

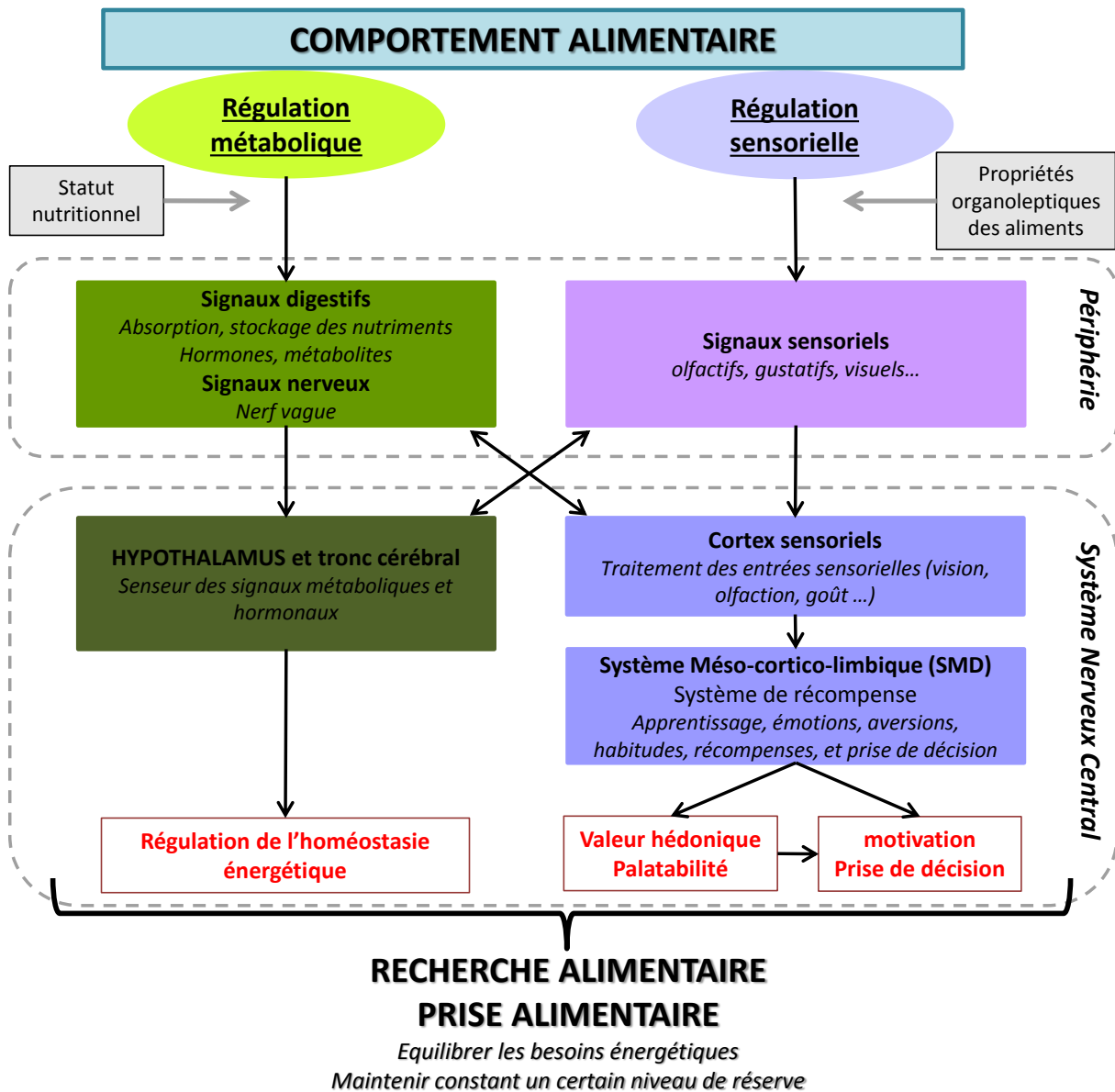


Figure 1: Présentation schématique des voies de régulation de la prise alimentaire

La régulation de la prise alimentaire résulte d'un équilibre entre deux voies régulatrices parallèles qui sont intégrées au niveau cérébral et qui conjointement permettent de maintenir l'homéostasie énergétique en initiant ou inhibant le comportement de recherche alimentaire:

Une régulation métabolique, qui met en jeu plusieurs signaux métaboliques orexigènes ou anorexigènes libérés au niveau périphérique en fonction de l'état nutritionnel des individus: et qui une fois intégrés au niveau de l'hypothalamus vont permettre d'initier ou d'inhiber la prise alimentaire

Une régulation sensorielle ou hédonique, qui passe notamment par les propriétés organoleptiques des aliments (la texture, le goût, l'odeur ... des aliments). Ces signaux sensoriels sont ensuite intégrés au niveau du cortex sensoriel puis relayés au système méso-cortico-limbique (SMD, système de récompense) qui permettent l'élaboration de la valeur hédonique des aliments, leur palatabilité influençant ainsi la prise de décision et la motivation des individus à rechercher de la nourriture.

A. La régulation homéostatique de la prise alimentaire

L'équilibre énergétique entre dépenses et apports énergétiques implique un échange de signaux métaboliques entre le tissu adipeux, reflet des stocks énergétiques, le tractus digestif, qui reçoit le bol alimentaire, et le système nerveux central (SNC), centre de régulation du comportement alimentaire et garant de l'homéostasie énergétique. En situation de balance énergétique négative, le SNC reçoit des signaux anaboliques qui vont stimuler la prise alimentaire et *a contrario*, en situation de balance énergétique positive, des signaux cataboliques inhibant la prise alimentaire.

1. Intégration centrale des signaux métaboliques : Le système hypothalamique

Des lésions et stimulations électriques de régions spécifiques de l'hypothalamus ont conduit à identifier l'hypothalamus comme un centre de régulation de l'appétit et de l'homéostasie énergétique (Stellar, 1994). De nombreux neurotransmetteurs synthétisés par les différents neurones de l'hypothalamus affectent la prise alimentaire et le poids, notamment s'ils sont injectés par voie centrale ou si leur activité est modifiée par des manipulations pharmacologiques ou génétiques. Les neurones qui expriment ces neurotransmetteurs reçoivent des informations de la périphérie *via* les hormones (leptine, insuline, ghréline) ou les nutriments, par l'intermédiaire des neurones senseurs de glucose dont l'activité est modulée par des variations de la glycémie ou des taux d'acides gras libres circulants. Ces populations neuronales interagissent entre elles de manière antagoniste ou synergique permettant l'adaptation aussi bien sur le court-terme que sur le long-terme.

L'hypothalamus est une région du cerveau située juste au-dessous du thalamus, qui se compose de plusieurs noyaux interconnectés les uns des autres: le noyau arqué (ARC), le noyau paraventriculaire (NPV), la zone hypothalamique latérale (LHA), le noyau ventromédian (NVM), et le noyau dorso-médian (NDM) (figure 2). Ces circuits sont composés de neurones dits de premier ordre, qui vont recevoir directement l'information des signaux métaboliques de la périphérie et la transmettre aux neurones dits de second ordre qui vont intégrer cette information (Figure 3).

HYPOTHALAMUS

Coupe sagittale du cerveau

Coupe coronale de l'hypothalamus

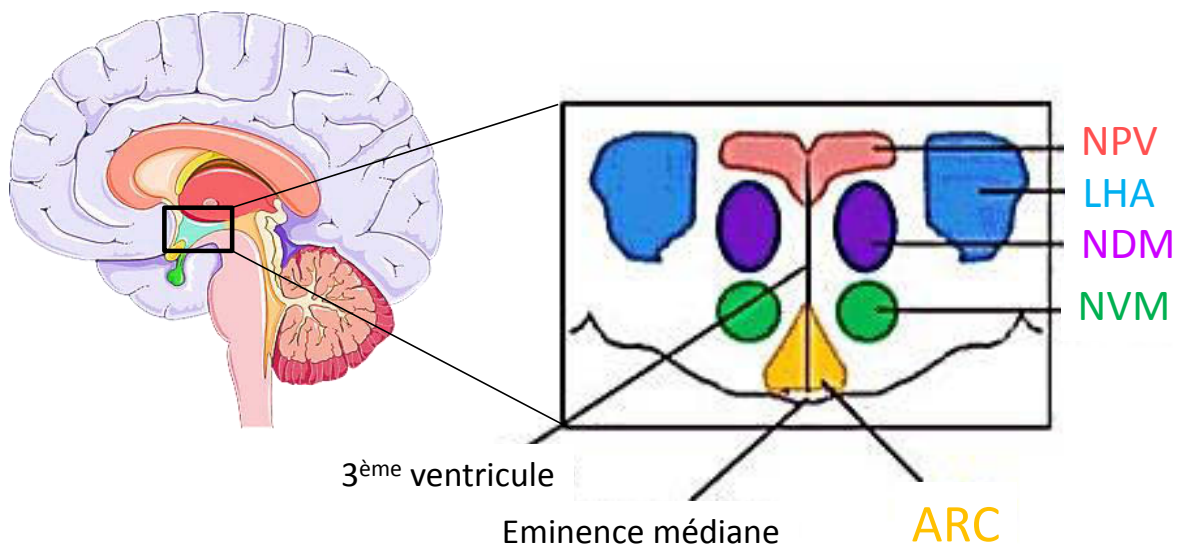


Figure 2: Présentation des différents noyaux hypothalamiques impliqués dans la régulation de la prise alimentaire

L'hypothalamus, est une région du cerveau située juste au-dessous du thalamus, qui se compose de plusieurs noyaux interconnectés les uns des autres: le noyau arqué (ARC), le noyau paraventriculaire (NPV), la zone hypothalamique latérale (LHA), le noyau ventromédian (NVM), et le noyau dorso-médian (NDM)

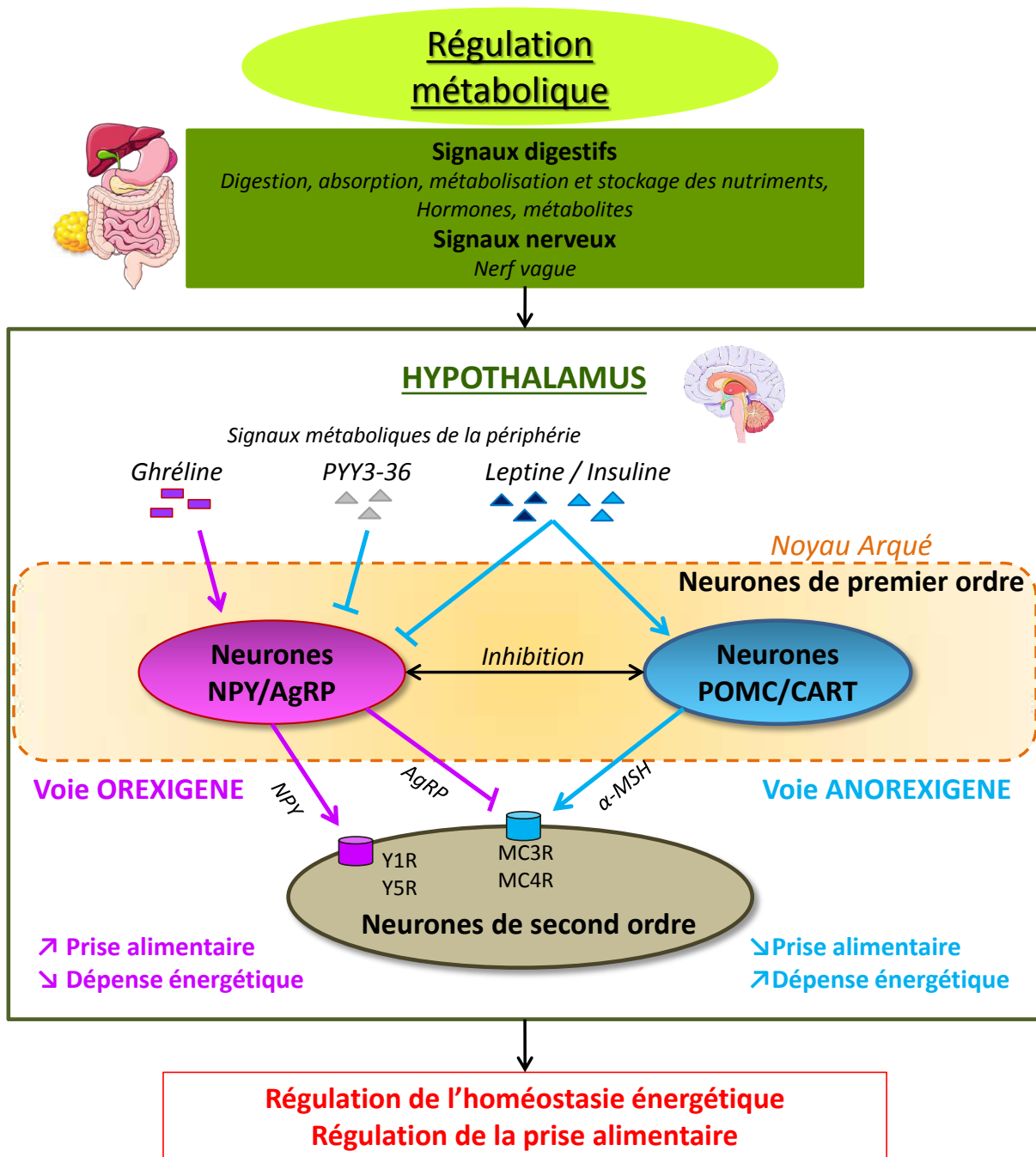


Figure 3: Présentation des circuits hypothalamiques impliqués dans la régulation de la prise alimentaire
 Les circuits hypothalamiques de la régulation de la prise alimentaire sont composés de neurones dits de premier ordre, qui vont recevoir directement l'information des signaux métaboliques de la périphérie et la transmettre aux neurones dits de second ordre qui vont intégrer cette information. L'activation de la voie orexigène augmente la prise alimentaire et diminue les dépenses énergétiques. L'activation de la voie anorexigène diminue la prise alimentaire et augmente les dépenses énergétiques.

- | | | |
|------------------|------------|--------------|
| Voie orexigène | Activation | Augmentation |
| Voie anorexigène | Inhibition | Diminution |

a. Centre de détection des signaux périphériques : Le noyau arqué (ARC)

Les neurones de premier ordre sont localisés dans l'ARC qui est une structure considérée comme la zone hypothalamique principale de détection des signaux métaboliques périphériques et ceci en raison de ses caractéristiques anatomiques (Figure 2). Grâce à sa localisation privilégiée, situé entre le 3^{ème} ventricule et l'éminence médiane dépourvue de barrière hémato-encéphalique (BHE), cette structure est accessible aux hormones circulantes et aux nutriments qui ne peuvent franchir la BHE et joue donc un rôle fondamental dans la transmission des messages périphériques aux autres structures cérébrales.

Cette structure est composée de deux populations neuronales clés dans la régulation du comportement alimentaire, l'une est un groupe de neurones co-exprimant des neuropeptides orexigènes stimulant la prise alimentaire: le neuropeptide Y (NPY) et le peptide apparenté à la protéine agouti (AgRP) (Broberger et al., 1998; Hahn et al., 1998), et l'autre est un sous-ensemble de neurones exprimant des neuropeptides anorexigènes inhibant la prise alimentaire, dont la pro-opiomélanocortine (POMC), et le transcrite régulé par la cocaïne amphétamine (CART) (Elias et al., 1998; Kristensen et al., 1998). Ces deux populations de neurones envoient des projections axonales aux neurones de second ordre dans les autres régions hypothalamiques, le NPV, le NVM et la LHA (Figure 3).

b. Les neurones orexigènes hypothalamiques (figure 4)

Les neurones orexigènes de premier ordre de l'ARC : les neurones à NPY et à AgRP (Figure 3)

Le NPY est un puissant neuropeptide orexigène, fortement exprimé au niveau de l'ARC dans des neurones qui projettent sur les neurones du NPV (Bai et al., 1985) ; il est par ailleurs largement exprimé dans le système nerveux central et périphérique. Le NPY agit comme un régulateur important du poids corporel par ses effets sur l'apport alimentaire et la dépense énergétique (Nguyen et al., 2011). Son niveau d'expression dans l'hypothalamus reflète l'état nutritionnel, il est maximal après restriction alimentaire et il retourne à des valeurs basales après renutrition (Chua et al., 1991; Davies and Marks, 1994). De plus, l'administration aigue de NPY au niveau central et en

| | Voie orexigène | Voie anorexigène |
|--|-----------------|-------------------------|
| Neuropeptides synthétisés par les neurones de premier ordre dans l'ARC | NPY/AgRP | α -MSH/CART |
| Neuropeptides synthétisés par les neurones du second ordre essentiellement dans le NPV et le LHA | Orexines MCH | TRH CRH Ocytocine |

Figure 4: Principaux neuropeptides hypothalamiques impliqués dans la régulation de l'homéostasie énergétique

NPY (Neuropeptide Y), AgRP (Agouti Related peptide), α -MSH (α -Melanocyte Stimulating Hormon), CART (Cocaïne & Amphetamine-Related Transcript), MCH (Melanin Concentrating Hormon), TRH (Thyrotropin Releasing Hormon), CRH (Corticotropin Releasing Hormon).

particulier dans le NPV stimule la prise alimentaire (Levine and Morley, 1984; Stanley and Leibowitz, 1985; Stanley et al., 1985), et des injections répétées de NPY dans le NPV déclenchent un phénomène d'hyperphagie qui aboutit à l'obésité (Currie and Coscina, 1995; Stanley et al., 1989). Le NPY se fixe à des récepteurs à sept domaines transmembranaires qui sont au nombre de six (Y1 à Y6) (Spinazzi et al., 2005). L'action du NPY sur la prise alimentaire passerait majoritairement par les sous types 1 et 5 présents au niveau hypothalamique et dans de nombreuses autres structures cérébrales et périphériques comme au niveau du bulbe olfactif.

Le peptide apparenté à la protéine Agouti (AgRP) est co-localisé à 90% dans les neurones à NPY de l'ARC (Hahn et al., 1998). Comme le NPY, c'est un orexigène puissant lorsqu'il est administré au niveau central (Rossi et al., 1998). Les souris qui sur-expriment l'AgRP sont hyperphagiques et obèses, suggérant un rôle du peptide endogène dans la régulation de l'homéostasie énergétique (Graham et al., 1997). L'AgRP a la particularité d'être un agoniste inverse des récepteurs des mélanocortines (MC-R) de type 3 et 4 (MC3R et MC4R) impliqués dans la régulation anorexigène de la prise alimentaire. Sa fixation sur ces récepteurs bloque les effets des mélanocortines et stimule la prise alimentaire (Quillan et al., 1998).

Les neurones orexigènes de second ordre : les neurones à orexines et à MCH

Les orexines et la MCH (pour Melanin Concentrating Hormone) sont deux neuropeptides essentiellement synthétisés par les neurones hypothalamiques des zones latérales LHA (Grimaldi et al., 2014; Morton et al., 2006; Naito et al., 1988) et jouent un rôle majeur dans l'équilibre énergétique (Sakurai et al., 1998).

Les orexines A et B (OXA et OXB) sont impliquées dans plusieurs fonctions endocrines incluant le sommeil, la récompense, et la régulation de la prise alimentaire (Tsujino and Sakurai, 2009), et projettent leurs fibres dans différentes régions du cerveau, y compris l'ensemble des voies olfactives (Caillol et al., 2003; Gascuel et al., 2012; Peyron et al., 1998). Les neurones à orexines qui projettent dans l'ARC excitent les neurones à NPY (Muroya et al., 2004; van den Top et al., 2004), et inhibent les neurones POMC (Ma et al., 2007), augmentant ainsi la prise alimentaire. L'injection en intracérébroventriculaire aiguë (icv) de ces deux orexines stimule la prise alimentaire avec une efficacité plus grande concernant l'OXA par rapport à l'OXB. En revanche les perfusions chroniques ne changent pas la consommation alimentaire ni le poids (Sakurai et al., 1998). L'orexine endogène joue un rôle dans la régulation du comportement alimentaire, vraisemblablement à court terme, puisque l'administration d'anticorps dirigés contre l'orexine A, ou d'antagoniste des récepteurs OX1, entraîne une diminution de la prise alimentaire chez des rats à jeun (Haynes et al., 2000; Yamada et al., 2000).

Les neurones à MCH projettent dans tout le SNC suggérant une participation à de nombreuses fonctions physiologiques. Le rôle le plus largement étudié pour la MCH est son rôle dans la régulation de l'homéostasie énergétique. L'injection de MCH dans l'ARC augmente la libération d'AgRP et diminue celle d' α -MSH, augmentant ainsi la prise alimentaire (Abbott et al., 2003). La perfusion centrale chronique de MCH chez les rongeurs entraîne une hyperphagie persistante et une augmentation du poids corporel et de l'adiposité (Qu et al., 1996).

c. Les neurones anorexigènes hypothalamiques (Figure 4)

Les neurones anorexigènes de premier ordre de l'ARC : les neurones à POMC (système mélanocortine) et à CART (Figure 3)

La pro-opiomélanocortine (POMC) est capable de générer, après clivage, plusieurs peptides, notamment les mélanotropines α MSH et γ MSH (Melanocyte Stimulating Hormones) et les endorphines. L' α MSH joue un rôle important dans le contrôle de l'homéostasie énergétique. Elle agit par l'intermédiaire des récepteurs MC3R et MC4R présents au niveau des neurones de second ordre des noyaux hypothalamiques (ARC, NVM et NPV) (Harrold et al., 1999; Mountjoy et al., 1994), et son administration centrale inhibe la prise alimentaire (Poggioli et al., 1986).

Le CART (pour Cocaine Amphetamine Regulated Transcript) est exprimé au niveau de l'ARC mais aussi du NPV, NDM et de la LHA et est coexprimé avec la POMC dans l'ARC. Le CART existe sous différentes formes. Les fragments 1-102 et 82-103 sont capables d'inhiber la prise alimentaire spontanée ou induite par des injections de NPY (Kristensen et al., 1998 ; Lambert et al., 1998), alors que le fragment 55-102 a des propriétés orexigènes lorsqu'il est injecté dans les noyaux ARC et NVM (Abbott et al., 2001) suggérant l'existence de différentes populations neuronales à CART.

Les neurones anorexigènes de second ordre : neurones à CRH et à TRH

Les neurones anorexigènes de second ordre se localisent principalement au niveau du NPV. Au moins trois neuropeptides synthétisés dans le PVN diminuent la prise alimentaire et le poids corporel: la CRH (pour Corticotropin Releasing Hormon), la TRH (pour Thyrotropin Releasing Hormone) et l'ocytocine (Kow and Pfaff, 1991; Olson et al., 1991a, 1991b; Glowa et al., 1992).

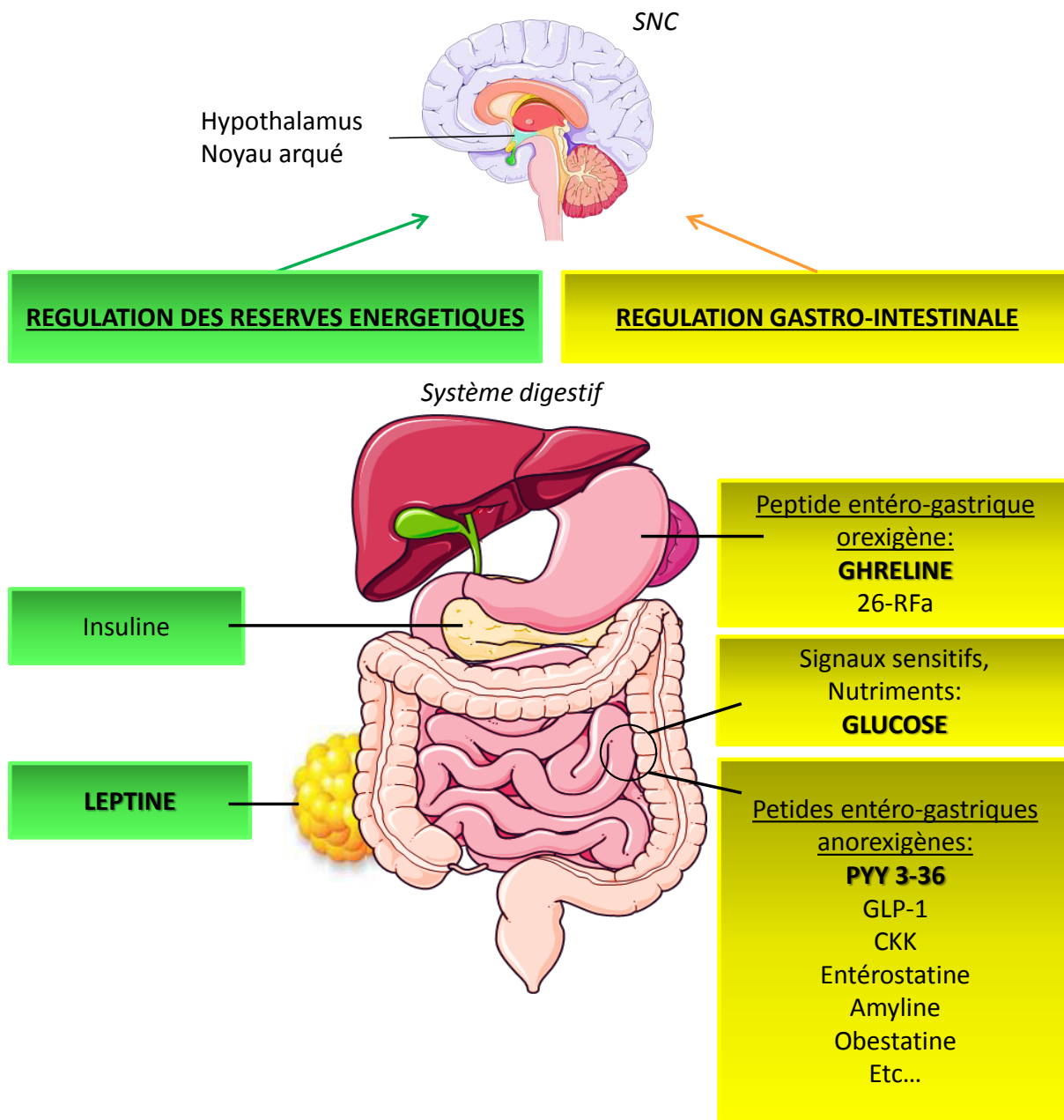


Figure 5: Présentation des signaux périphériques impliqués dans la régulation de la prise alimentaire

Les noyaux hypothalamiques gouvernant la prise alimentaire reçoivent des signaux d'origine gastro-intestinale directement liés à l'ingestion et à la digestion des aliments, et des signaux métaboliques dépendant du niveau des réserves énergétiques. Ces deux catégories de signaux diffèrent par rapport à leur durée d'effets. Les signaux gastro-intestinaux sont des effecteurs à court terme générés par une prise alimentaire récente. Les signaux des réserves énergétiques sont générés par le besoin constant du corps en énergie et fournissent une influence sur le long terme.

Les signaux qui ont été étudiés au cours de cette thèse sont indiqués en gras.

GLP-1= Glucagon like peptide 1; CCK= Cholécystokinine; PYY3-36= Fragment 3-36 du neuropeptide YY

Le contrôle central homéostatique de la prise alimentaire implique deux populations neuronales hypothalamiques majeures : une population orexigène composée de neurones NPY et AgRP, et une population anorexigène composée de neurones POMC et CART. Ces neurones intègrent d'une part des signaux périphériques orexigènes et anorexigènes induisant ou inhibant la prise alimentaire, et d'autre part des signaux métaboliques qui permettent de réguler le stock de tissu adipeux. Nous allons passer en revue ces différents signaux ci-après. Seuls les signaux principalement étudiés au cours de ma thèse seront détaillés.

2. Signaux périphériques impliqués dans l'homéostasie énergétique

Les noyaux hypothalamiques gouvernant la prise alimentaire reçoivent des informations d'origine gastro-intestinale directement liées à l'ingestion et à la digestion des aliments, et des informations métaboliques dépendant du niveau des réserves énergétiques (Figure 5).

a. Signaux gastro-intestinaux

En plus de ses fonctions de digestion et d'absorption, l'intestin joue un rôle important dans le contrôle de l'homéostasie énergétique, en particulier dans la régulation à court terme de la prise alimentaire. Il transmet des signaux impliquant les nutriments (glucose, acides gras, acides aminés), la distension gastrique et la libération au cours de la digestion de peptides et hormones entérogastriques. La durée d'action des signaux d'origine gastro-intestinale correspond à l'intervalle inter-prandial.

Les signaux sensitifs et l'arrivée des nutriments dans le tube digestif

La distension gastrique est provoquée par l'arrivée des aliments dans l'estomac. Cette distension stimule les mécanorécepteurs de la paroi gastrique qui, par voie vagale, transmettent les informations au SNC. Leur effet d'inhibition sur la prise alimentaire reste transitoire.

Au cours de la digestion, les aliments sont dégradés par des enzymes libérant ainsi des nutriments comme le glucose, les acides aminés, les acides gras. La présence de nutriments dans l'intestin grêle est détectée par des chémorécepteurs situés tout le long de l'intestin grêle et spécifiques de chaque type de nutriment. Ils contribuent à prolonger la durée de la période de satiété postprandiale en stimulant la sécrétion de différents peptides anorexigènes par les cellules intestinales. Les nutriments

peuvent également agir directement sur les centres de régulation de la prise alimentaire au niveau du SNC pour inhiber la prise alimentaire (Cota, 2006; Obici et al., 2002).

Les hormones et peptides entérogastriques

Le contact des aliments avec le tube digestif entraîne la sécrétion d'un certain nombre d'hormones ou de peptides (Ghréline, insuline, cholécystokinine (CCK), PYY 3-36, bombésine, entérostatine, glucagon-like peptide-1, apoprotéine A-IV...) impliqués dans le contrôle périphérique de la prise alimentaire, qui vont agir au niveau de l'hypothalamus soit directement (comme le peptide tyrosine tyrosine (PYY3-36) et la ghréline) soit indirectement via les fibres vagues et le noyau du tractus solitaire (comme pour la cholécystokinine (CCK). Dans ce dernier cas des projections du noyau du tractus solitaire, directes ou relayées par le noyau parabrachial, vont innover les différents noyaux hypothalamiques.

La ghréline

La ghréline est principalement sécrétée par l'estomac et le duodénum, en anticipation des repas. Ce peptide a initialement été isolé comme étant le ligand endogène du récepteur sécrétagogue à l'hormone de croissance (GHS-R) (Howard et al., 1996) et pour sa capacité à stimuler la sécrétion d'hormone de croissance (GH). Plus tard, la ghréline a été identifiée comme étant l'une des principales hormones peptidiques gastro-intestinales stimulant l'appétit lorsque la balance énergétique est négative (Druce et al., 2005). La concentration plasmatique de la ghréline augmente en période pré-ingestive puis diminue rapidement ensuite. Son administration aïgue par voie parentérale augmente la prise alimentaire chez l'homme et le rat, et son administration chronique chez le rat induit une hyperphagie persistante et l'accumulation de graisse. La ghréline est donc responsable de la sensation de faim et de l'initiation de la prise de nourriture (Cummings et al., 2001). Sa fonction passe notamment par son action au niveau du noyau arqué hypothalamique, où la ghréline active le système orexigène (neurones NPY/AGRP) et également d'autres aires cérébrales impliquées dans le contrôle de la récompense alimentaire (Abizaid et al., 2006; Egecioglu et al., 2010) incitant ainsi à la prise alimentaire. Simultanément la ghréline inhibe indirectement le système anorexigène (neurones POMC), contrecarrant les effets de l'insuline et de la signalisation de la leptine dans l'hypothalamus (Horvath et al., 2001; Zigman and Elmquist, 2003).

Le peptide tyrosine tyrosine 3-36 (PYY3-36)

Le PYY est une hormone peptidique sécrétée majoritairement par les cellules endocrines de l'intestin grêle et du colon, en période post-prandiale. Le PYY circule majoritairement sous deux isoformes: le PYY1-36 et PYY3-36. Le PYY3-36 est la forme active circulante majoritaire que l'on trouve à la

périphérie et qui possède des propriétés anorexigènes, retarde la vidange gastrique, les sécrétions pancréatiques et stomacales, et favorise l'absorption des fluides et des électrolytes. La concentration plasmatique en PYY 3-36 est directement en rapport avec la quantité de calories ingérées et reste élevée durant plusieurs heures après la fin du repas (Adrian et al., 1985). Chez le rongeur et chez l'homme, des injections périphériques de PYY sont capables de diminuer la prise alimentaire (Batterham et al., 2002, 2003), et cet effet persiste 12 heures après l'arrêt de l'administration du peptide.

Le PYY se fixe à tous les récepteurs du NPY, Y1 à Y5, alors que le PYY 3-36 se fixe préférentiellement au récepteur Y2 et dans une moindre mesure aux récepteurs Y1 et Y5 (Larhammar, 1996). Son action au niveau des récepteurs pré-synaptiques Y2 portés par les neurones NPY/AgRP du noyau arqué de l'hypothalamus inhibe la prise alimentaire en diminuant la libération de NPY. Les effets anorexigènes du PYY 3-36 sont abolis chez les souris invalidées pour le récepteur Y2 et réduits par des antagonistes de ce récepteur (Batterham et al., 2002). L'inhibition des neurones NPY est accompagnée d'une augmentation modérée de l'activité des neurones à POMC qui conjointement contribuent à réduire la prise alimentaire.

Le glucose

Le glucose est la principale source d'énergie des organismes et c'est le principal substrat énergétique pour le cerveau. Sa concentration plasmatique est un fort indicateur du statut nutritionnel, et est étroitement contrôlée par la libération d'insuline par les cellules β du pancréas, permettant ainsi un contrôle strict de la glycémie malgré des variations constantes d'apport et de consommation (Thorens, 2008). L'absorption du glucose est effectuée par deux grandes familles de protéines associées à la membrane: les SGLT, co-transporteurs Na^+ /glucose, réalisant un transport actif de glucose dans le rein et l'intestin (Yu et al., 2010); et les GLUTs, transporteurs du glucose qui relaient la diffusion facilitée du glucose dans pratiquement toutes les cellules (McEwen and Reagan, 2004). La détection des variations de glucose au niveau périphérique transmet un signal anorexigène au cerveau par l'intermédiaire du nerf vague.

Le cerveau est lui-même doté de neurones se comportant comme des glucorécepteurs ou «senseurs» capables d'interpréter les fluctuations locales des taux de glucose extracellulaires et d'y répondre en modulant leurs activités (Burdakov et al., 2005; Gonzalez et al., 2008). Les neurones sensibles au glucose se retrouvent dans de nombreuses régions du cerveau, principalement dans les zones hypothalamiques clairement impliquées dans le contrôle de la prise alimentaire et de l'homéostasie énergétique (Williams et al., 2001); mais également dans d'autres régions cérébrales telles que le tronc cérébral, l'amygdale, le septum, l'hippocampe et le bulbe olfactif (Anand et al.,

1964; Balfour et al., 2006; Nakano et al., 1986; Ren, 2009; Ritter et al., 1981; Shoji, 1992; Tucker et al., 2010, 2013a). Ces neurones glucosensibles détectent le glucose principalement grâce aux transporteurs GLUT2 qu'ils expriment (Stolarczyk et al., 2010a), et peuvent ainsi jouer un rôle dans : la communication des informations concernant l'état nutritionnel, aux neurones environnants ; et dans le maintien des besoins énergétiques locaux pour la fonction synaptique (Routh et al., 2007). Au niveau hypothalamique, le glucose module directement la régulation hypothalamique de la prise alimentaire en stimulant les neurones anorexigènes POMC (Ibrahim et al., 2003) et inhibant les neurones orexigènes de l'ARC (NPY) ou du LHA (orexine) (Burdakov et al., 2005; Muroya et al., 1999), ce qui conduit à l'arrêt de la prise alimentaire.

b. Signaux métaboliques

De nombreux signaux métaboliques permettent d'adapter la prise alimentaire en fonction des stocks énergétiques de l'organisme, notamment du niveau d'adiposité. L'action de ces signaux est retardée par rapport à la prise alimentaire. Ils agissent en modifiant l'impact des signaux à court-terme (précédemment décrits), sur les régions cérébrales qui contrôlent la prise alimentaire. Ils ont également une action directe sur les zones hypothalamiques contrôlant l'équilibre énergétique. Les deux principales hormones sont anorexigènes et sont la leptine et l'insuline.

L'insuline

L'insuline est une hormone peptidique circulante sécrétée au niveau pancréatique qui joue un rôle central dans la régulation de l'homéostasie du glucose. En cas d'hyperglycémie, (supérieur à 1g/litre de sang), les cellules β du pancréas, situées au niveau des îlots de Langerhans sécrètent l'insuline dans le sang. Reconnue par les hépatocytes l'insuline déclenche : 1) la transformation du glucose en glycogène par l'activation de la glycogène synthétase, ainsi que 2) l'augmentation des entrées de glucose dans les adipocytes du foie où il sera stocké sous forme de tryglycéride.

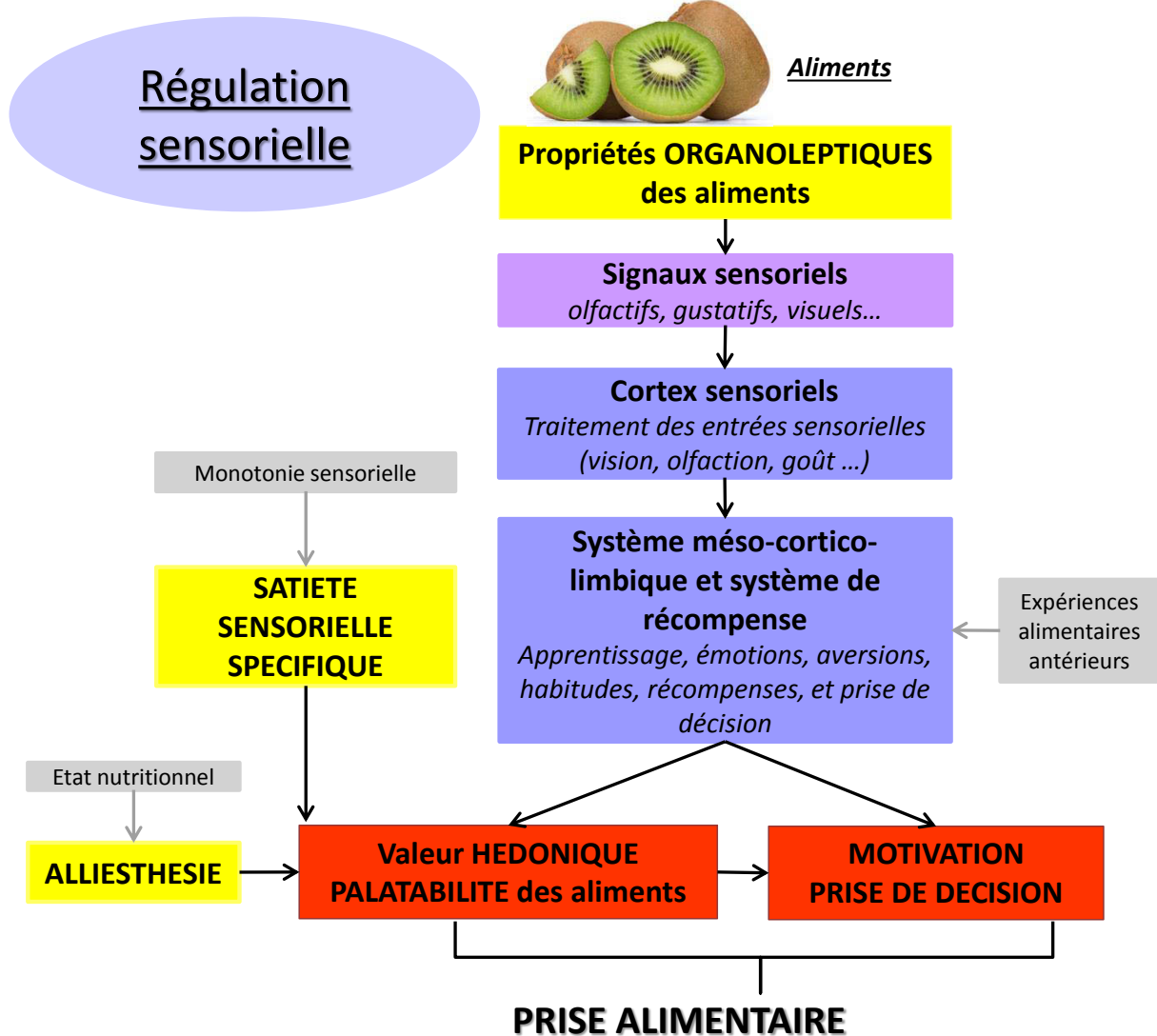
L'insuline joue également un rôle important au niveau des neurones de l'hypothalamus, en particulier de l'ARC. Comme la leptine, l'insuline active les neurones anorexigènes POMC et inhibition les neurones orexigènes NPY / AgRP. A travers ces effets, l'insuline relaie un signal anorexigène au cerveau. L'activité de l'insuline dans le SNC est importante dans la régulation du poids corporel (Chavez et al., 1995; Figlewicz et al., 1995). Son rôle dans la régulation du bilan énergétique est essentiel puisque la suppression du récepteur spécifique de l'insuline des neurones cibles provoque un phénotype d'obésité chez la souris (Brüning et al., 2000).

La leptine

La leptine, est une des principales hormones anorexigènes circulantes. Elle est sécrétée par les adipocytes périphériques et est l'un des principaux peptides responsable du contrôle de

l'homéostasie lipidique (Stanley, 2005). Il existe également une production discrète au niveau des tissus périphériques, comme le placenta, l'estomac, des muscles et la MO (Bado et al., 1998; Baly et al., 2007; Masuzaki et al., 1997; Wang et al., 1998; Zhang et al., 1994), et dans certaines structures centrales, comme le cortex, le cervelet, l'hypophyse, l'hypothalamus et le BO (Morash et al., 1999). Les taux circulants de l'hormone sont directement corrélés à la masse grasse et fluctuent en fonction de l'état nutritionnel (Friedman and Halaas, 1998). Après le repas, la leptine circulante augmente et atteint un maximum en quelques heures (Saladin et al., 1995; Schoeller et al., 1997). La leptine circulante pénètre dans le cerveau par la barrière hémato-encéphalique (BHE) via des récepteurs spécifiques. Six isoformes du récepteur de la leptine (Ob-R) ont été rapportées chez les rongeurs. Elles diffèrent principalement par la longueur du domaine cytoplasmique qui résulte de l'épissage alternatif de transcrits à partir d'un seul gène Ob-R (Ahima and Osei, 2004; Bjørbaek et al., 1997; Morris and Rui, 2009; Yamashita et al., 1998). Les récepteurs sont fortement exprimés dans les neurones de l'hypothalamus, en particulier l'ARC. L'activation de ces récepteurs provoque une augmentation de l'activité neuronale des neurones POMC / CART alors qu'elle diminue l'activité des neurones NPY / AgRP (Sahu, 2003), ce qui réduit la prise alimentaire et la dépense énergétique.

Les signaux métaboliques relatifs à l'état énergétique interne des individus ainsi que leur intégration au niveau cérébral, sont à ce jour les plus étudiés et les mieux connus pour expliquer la régulation de la prise alimentaire. Ces signaux permettent à l'organisme de détecter un manque d'énergie interne et de réagir rapidement en initiant des comportements pour augmenter l'apport énergétique. Cependant, la régulation de la prise alimentaire ne se résume pas au seul contrôle de l'homéostasie régulée par les signaux métaboliques. Manger est un besoin vital fortement associé au plaisir. La valeur hédonique des aliments, résultant de leur appréciation sensorielle (olfactive, gustative, visuelle...) joue également un rôle important dans la régulation de la prise alimentaire. Le plaisir associé aux aliments est orienté vers les aliments palatables, en général riches en énergie (sucres et graisses). La valeur hédonique des aliments joue ainsi un rôle incitateur essentiel vis-à-vis de la prise alimentaire, pour assurer le maintien de l'homéostasie énergétique de l'organisme (Cabanac, 1971; Esch and Stefano, 2005; Peciña et al., 2006). Depuis les travaux pionniers de Le Magnen (Le Magnen 1984, 1987) montrant les processus de satiété sensorielle et d'alliesthésie, on progresse dans la compréhension de la régulation hédonique de la prise alimentaire. Les mécanismes neurophysiologiques qui la sous-tendent font intervenir des modifications de la perception sensorielle en fonction de l'état métabolique et leur intégration centrale en lien avec les circuits de la récompense et de la motivation.



- **Pré-ingestion:** Recherche nourriture, choix alimentaire, préparation et initiation du repas dans l'optimisation du traitement des nutriments et de la consommation d'énergie
 - **Ingestion:** Choix des aliments, volume du repas, arrêt de la PA
 - **Post-ingestion:** satiété sensorielle, absence de désir, bien-être

Figure 6: La régulation sensorielle de la prise alimentaire

La valeur hédonique des aliments joue un rôle essentiel dans la prise alimentaire et permet d'assurer le maintien de l'homéostasie énergétique.

L'élaboration de la valeur hédonique des aliments passe par l'intégration, au niveau du SNC, de signaux sensoriels établis grâce aux propriétés organoleptiques des aliments et est influencée par l'environnement, la composition sensorielle du repas (satiété sensorielle), les caractéristiques et le degré de motivation des individus, ainsi que de leur état nutritionnel (principe de l'alliesthésie).

B. Les facteurs hédoniques dans la régulation de la prise alimentaire

1. La régulation sensorielle de la prise alimentaire (Figure 6)

a. Les structures cérébrales impliquées dans l'élaboration de la valeur hédoniques des aliments

« Vouloir » et « Aimer » manger sont deux déterminants essentiels dans le comportement de prise alimentaire. Le système homéostatique est sous la dépendance d'un système de contrôle plus large, appelé par certains auteurs système de contrôle "non-homéostatique", qui met en jeu les structures méso-cortico-limbiques incluant l'intégration des systèmes sensoriels et les circuits de la récompense. Ces systèmes sont impliqués dans l'apprentissage, la mémorisation des expériences aversives, le renforcement du comportement en fonction de son caractère hédonique et la transformation de la motivation en comportement actif (Bermudez-Silva et al., 2010; Rasmussen and Huskinson, 2008; Rasmussen and Newland, 2008). D'autres structures centrales reliées aux systèmes sensoriels participent également à la régulation de la prise alimentaire - le thalamus (pour toutes les modalités sensorielles exceptées l'olfaction), le BO, le cortex sensoriel et leurs liaisons avec les structures limbiques – mais leur implication et les mécanismes neurophysiologiques sous-jacents sont encore en cours d'étude (Rolls et al., 2005). Plusieurs études ont montré que ces structures répondent aux propriétés organoleptiques des aliments, contribuent à attribuer aux aliments leur caractère agréable ou non (leur palatabilité) et à y associer un comportement motivé (Bellisle, 2005; Chapelot and Louis-Sylvestre, 2008; Fantino, 1984; Herman and Polivy, 2005; Mattes, 2006; Rolls et al., 2004, 2006; Sørensen et al., 2003 ; Rolls et al., 1982). La palatabilité des aliments est définie comme une évaluation hédonique positive des caractéristiques organoleptiques des aliments et reflète ce que l'on a déjà appris sur leur qualité sensorielle et nutritionnelle (Yeomans, 1998).

b. L'implication des propriétés organoleptiques des aliments dans la régulation de la prise alimentaire

La prise alimentaire s'inscrit dans une séquence d'évènements auxquels correspondent des comportements associés à des sensations subjectives (Basdevant et al., 1990; Bellisle, 2005), comme par exemple la sensation d'appétit qui correspond à l'envie de manger un aliment dont on attend du plaisir et de la satisfaction, la sensation de rassasiement qui va déterminer le volume du repas et l'arrêt de la prise alimentaire, mais également la sensation de satiété qui se traduit par l'absence du

désir de manger (Le Magnen 1982 dans Bellisle, 2005). Au cours de ces événements, ce sont les propriétés organoleptiques des aliments qui permettent à l'individu d'identifier l'aliment, de créer des attentes, et d'anticiper le plaisir ou le déplaisir qu'il va procurer en relation avec ses expériences antérieures. Ces signaux sensoriels permettent d'orienter l'individu vers une source de nourriture, d'influencer ses préférences alimentaires et les quantités ingérées, et participent à l'installation du rassasiement pendant et après l'ingestion. De plus les stimuli sensoriels liés aux aliments déclenchent, avant et pendant l'ingestion, des réponses physiologiques anticipées et rapides, telles que la salivation (Wooley and Wooley, 1973), la sécrétion d'acide gastrique (Feldman and Richardson, 1986), et la libération d'hormones gastro-intestinales (Smeets et al., 2010) dans le but d'optimiser le traitement des nutriments à travers le tractus gastro-intestinal (Feldman and Richardson, 1986) préparant l'organisme à ingérer, digérer, absorber et métaboliser les aliments. Les signaux sensoriels interagissent ainsi avec le métabolisme de l'individu pour influencer son comportement et interviennent de manière fonctionnelle dans la régulation des apports en énergie.

c. Les facteurs impliqués dans les variations de palatabilité au cours d'un repas : La satiété sensorielle et l'alliesthésie

La palatabilité des aliments intègre non seulement les signaux organoleptiques propres aux aliments, mais également l'environnement, le contexte, ainsi que les connaissances, la motivation et les attentes du sujet (Koster, 2006). La palatabilité n'est donc pas un paramètre statique mais varie en fonction de l'environnement, des caractéristiques et du degré de motivation de l'individu, et de son état physiologique. Parmi ces facteurs, la satiété sensorielle spécifique (Rolls, 1986) et l'alliesthésie (Cabanac, 1979) sont des paramètres essentiels dans la régulation de la prise alimentaire *via* le système hédonique et permettent d'expliquer les changements de palatabilité au cours du repas.

Ces changements de palatabilité surviennent en réponse à la monotonie sensorielle d'un repas, que l'on appelle la satiété sensorielle, ou en réponse à l'état métabolique d'un individu définissant le principe d'alliesthésie introduit par Cabanac et Duclaux en 1973. Ces auteurs montrent, que la valeur hédonique procurée par l'odeur d'une orange est fortement diminuée après ingestion de glucose par les individus (Figure 7). Cette expérimentation définit clairement le principe de l'alliesthésie qui met en évidence l'influence de l'état nutritionnel sur la valeur hédonique des aliments.

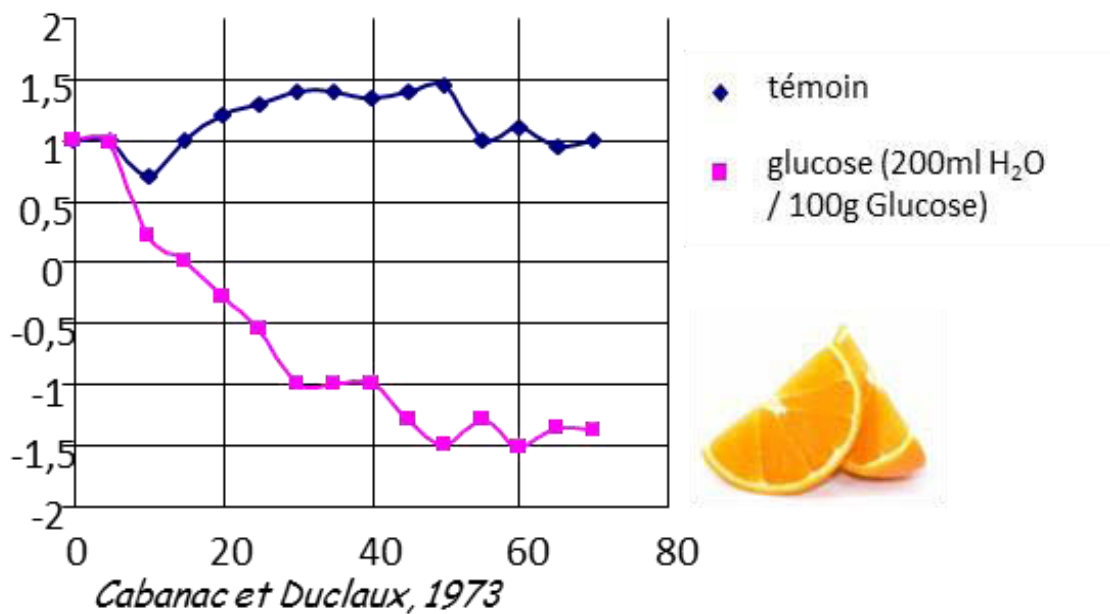


Figure 7: Introduction au principe de l'alliesthésie (D'après Cabanac et Duclaux, 1973)

Le principe de l'alliesthésie a été introduit par Cabanac et Duclaux en 1973. L'alliesthésie définit l'influence de l'état nutritionnel sur la valeur hédonique d'un aliment.

Dans cette expérimentation, Cabanac et Duclaux montrent que la valeur hédonique de l'odeur d'orange est fortement diminuée, au cours du temps, après une ingestion de glucose.

Axe des ordonnées= échelle hédonique; axe des abscisses= temps en minutes

La satiété sensorielle spécifique correspond à la diminution de l'appétit vis-à-vis d'un aliment consommé au cours d'un repas, sans que cela diminue ou affecte l'appétit pour les autres aliments (Rolls, 1986). Ainsi, le plaisir que nous procure le goût, l'odeur et la vue d'un aliment qui est consommé jusqu'à satiété, diminue par rapport aux aliments non consommés. Par exemple, après une consommation de banane, la valeur hédonique que nous attribuons pour la banane ainsi que pour l'odeur de banane est diminuée de manière significative, par rapport à celle de d'autres aliments et odeurs. Un résultat équivalent est également observé pour le poulet (Albrecht et al., 2009; Rolls, 1997). En général, les caractéristiques sensorielles (goût, odeur) d'un repas reflètent sa teneur en macronutriments (Boesveldt and Lundström, 2014; van Dongen et al., 2012), et la satiété sensorielle-spécifique est ainsi pensée pour favoriser l'apport d'une variété d'aliments et de macronutriments. C'est un facteur important influençant la quantité de chaque aliment consommé au cours d'un repas. Par conséquent les repas composés d'une grande variété d'aliments peuvent, en raison de la satiété sensorielle spécifique, favoriser la prise de nourriture en excès (Hetherington and Boyland, 2007). Chez l'homme, un repas composé d'aliments variés peut conduire à une prise alimentaire supérieure de 60% en calories par rapport à un repas uniforme (Rolls et al., 1984). Il a été montré chez l'homme comme chez les rongeurs que le rassasiement sensoriel survient après un temps de stimulation lié au fait de manger, de mâcher, de sentir la nourriture, aboutissant progressivement à ne plus ressentir le plaisir gustatif et olfactif associé (Rolls, 1981, 2007; Rolls et al., 1984; Sørensen et al., 2003).

Les entrées sensorielles, comme la vue, le goût ou l'olfaction sont ainsi capables d'interférer avec l'homéostasie énergétique de l'organisme en modifiant la palatabilité des aliments et donc en modulant leur consommation (Rolls, 2015). Parmi elles, l'olfaction est particulièrement importante dans le déclenchement, le déroulement et l'arrêt de la prise alimentaire, en participant aux différents changements métaboliques pré-prandiaux, au choix des aliments, et au développement de la satiété spécifique au fur et à mesure de la dégustation d'un aliment (Duclaux et al., 1973; Yeomans, 2006).

2. La régulation olfactive de la prise alimentaire

a. Implication de l'olfaction dans la régulation de la prise alimentaire

Contrairement à l'idée reçue, le goût d'un aliment n'est pas uniquement détecté par les papilles de la bouche mais passe essentiellement par le nez. Lorsque l'on mâche, on libère les molécules odorantes de l'aliment qui circulent pour remonter jusque dans la cavité nasale. Cette voie rétro-nasale est la principale source qui confère leur flaveur aux aliments, en association avec les goûts salé, sucré, amer, acide et umami, ce qui explique pourquoi, lorsque l'on est enrhumé, nous ne ressentons plus ou pas de la même façon les aliments que nous consommons.

Les odeurs alimentaire font donc partie intégrante de la perception des saveurs, et façonnent l'expérience du goût et de la texture (Small, 2004). L'olfaction signale également la présence à proximité d'aliments avant même qu'ils aient été identifiés visuellement (Stevenson, 2010). La perception des odeurs alimentaires agréables (telles que l'odeur de pizza ou de biscuits chauds) stimule la salivation (Engelen et al., 2003; Pangborn and Berggren, 1973), l'appétit et la consommation prospective, et augmente l'apport alimentaire. De nombreux établissements ont ainsi développé une stratégie marketing basée sur l'olfaction en utilisant des arômes « alléchants » afin d'attirer les clients (Chebat and Michon, 2003).

L'olfaction participe fortement à l'élaboration de la valeur hédonique des aliments (Lutter and Nestler, 2009; Saper et al., 2002). La palatabilité d'un aliment évaluée seulement grâce à des indices olfactifs, sans ingestion de nourriture, est suffisant pour moduler la quantité de nourriture ingérée (Rolls et al., 1984; Sørensen et al., 2003), et peut même, dans certains cas, conduire à la suralimentation (Le Magnen, 1999).

L'odeur participe à plusieurs étapes de la consommation alimentaire (Fantino, 1984). Au cours de la phase pré-prandiale, lorsque la nourriture est présentée à des sujets non rassasiés, les stimuli olfactifs augmentent la sécrétion gastrique de la gastrine et de la ghréline (Feldman and Richardson, 1986; Massolt et al., 2010), générant ou accentuant ainsi le signal orexigène. Les niveaux d'insuline sont également augmentés (Johnson and Wildman, 1983) probablement par anticipation « olfactive » d'une future augmentation glycémique. Les odeurs appétissantes induisent également un réflexe salivaire grâce à l'activation de la glande sous-maxillaire (Lee and Linden, 1992) et/ou un



Source: le blog du monde du Snacking - Publié le 20 août 2014 par Maxi

réflexe de déglutition (Ebihara et al., 2006; Munakata et al., 2008). Dans une phase ultérieure, l'olfaction participe à la satiété sensorielle spécifique (Epstein et al., 2003; Rolls, 1997). Le rassasiement est lié à la durée et la complexité de la stimulation olfactive dans la cavité buccale; plus la stimulation est longue (par exemple, par des solides, par opposition aux boissons) ou plus l'arôme est complexe, plus le rassasiement sera important (Ruijschop et al., 2008, 2010). En revanche, comme nous l'avons vu précédemment, la consommation alimentaire peut être relancée par un aliment apportant de nouvelles qualités sensorielles passant en particulier par l'olfaction (Romer et al., 2006). Cet effet a été notamment montré par les travaux de Le Magnen en 1999. Des rats auxquels leur aliment habituel est présenté avec une odeur nouvelle (par odorisation) augmentent leur prise alimentaire de 43%. Ces résultats mettent en évidence que l'apparition de nouveaux stimuli olfactifs inhibe le signal de satiété et conduisent l'animal à consommer au-delà de ses besoins physiologiques (Le Magnen, 1999).

b. Implication des dysfonctionnements olfactifs dans les perturbations de la prise alimentaire

Afin de mieux comprendre l'implication du système olfactif 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 c'est-à-dire par une ablation chirurgicale du BO, qui est une technique expérimentale couramment utilisée chez les rongeurs dans la mise en place de modèles de comportement de type dépressif (Song and Leonard, 2005). L'ablation des bulbes olfactifs chez le rongeur, entraîne une diminution de la taille des repas, compensée par une augmentation du nombre de repas, voir même un effet de grignotage persistant (Larue and Le Magnen, 1972; Meguid et al., 1997) pouvant entraîner une surconsommation et /ou une prise de poids excessif (Larue and Le Magnen, 1970; Zukerman et al., 2009). Cependant ces effets sont observables uniquement durant les premières semaines suivant l'opération et disparaissent après 40 jours soulignant une adaptation fonctionnelle des mécanismes de la prise alimentaire après bulbectomie (Meguid et al., 1997).

D'autre part, les rats rendus anosmiques ne répondent plus normalement à des changements dans leur régime alimentaire. Ils perdent leur capacité à discriminer différents aliments (Le Magnen, 1969), et leur préférence pour les aliments très agréables au goût (Larue and Le Magnen, 1967; Primeaux et al., 2003). De plus, Larue et Le Magnen (1967) ont constaté que les rats bulbectomisés, contrairement aux rats contrôles fictivement opérés, ne réussissent plus à compenser un régime alimentaire peu nutritif (dilué par 25% de cellulose) par une augmentation de leur prise alimentaire, suggérant l'implication de l'olfaction dans la régulation homéostatique de la prise alimentaire. Par ailleurs, l'ablation du bulbe olfactif potentialise l'induction de l'obésité associée à une lésion de

l'hypothalamus ventro-médian (Larue et Le Magnen 1968). En utilisant la même approche expérimentale, Primeaux et al. (2007) ont montré que l'anosmie chez des rats génétiquement prédisposés à l'obésité, entraîne une augmentation de leur prise alimentaire, de l'expression du peptide orexigène NPY au niveau de l'hypothalamus et de l'amygdale ainsi qu'une diminution de l'expression du récepteur Y2R au sein de ces structures (Primeaux et al., 2007).

Chez l'homme, des études épidémiologiques montrent que certains troubles de l'alimentation sont également associés à un dysfonctionnement du système olfactif (Oral et al., 2013; Rapps et al., 2010). Par exemple, les personnes hyposmiques (ayant des capacités olfactives diminuées), décrivent une diminution de la perception des saveurs alimentaires associée à une diminution de l'appétit et du poids (Bonfils et al., 2005).

Comme nous le verrons dans le chapitre suivant, il existe des voies neuro-anatomiques communes entre le système olfactif et le système de régulation de la prise alimentaire, notamment l'hypothalamus. Des études anatomiques et électrophysiologiques suggèrent l'existence d'un axe olfacto-hypothalamique dans le contrôle de la prise alimentaire (Gascuel et al., 2012; Price et al., 1991). En effet, une stimulation électrique du BO ou du cortex olfactif, chez le rat, déclenche une réponse dans la région hypothalamique latérale. De plus, de nombreuses structures recevant des afférences du BO se projettent ensuite vers l'hypothalamus. En revanche la signalisation fonctionnelle de ces connexions n'a pas encore été clarifiée.

L'ensemble de ces données suggèrent que l'intégrité du système olfactif est nécessaire pour assurer la régulation efficace du comportement alimentaire et que son absence induit des perturbations métaboliques (anorexie, désorganisation du rythme des repas, hyperphagie). Cependant, les mécanismes sous-tendant cette régulation olfactive de la prise alimentaire sont encore mal compris. Réciproquement, l'état nutritionnel des individus influence non seulement la valeur hédonique de l'odeur d'un aliment, mais également les performances et la fonctionnalité du système olfactif. Cette régulation du système olfactif par l'état nutritionnel est présentée dans le chapitre suivant.

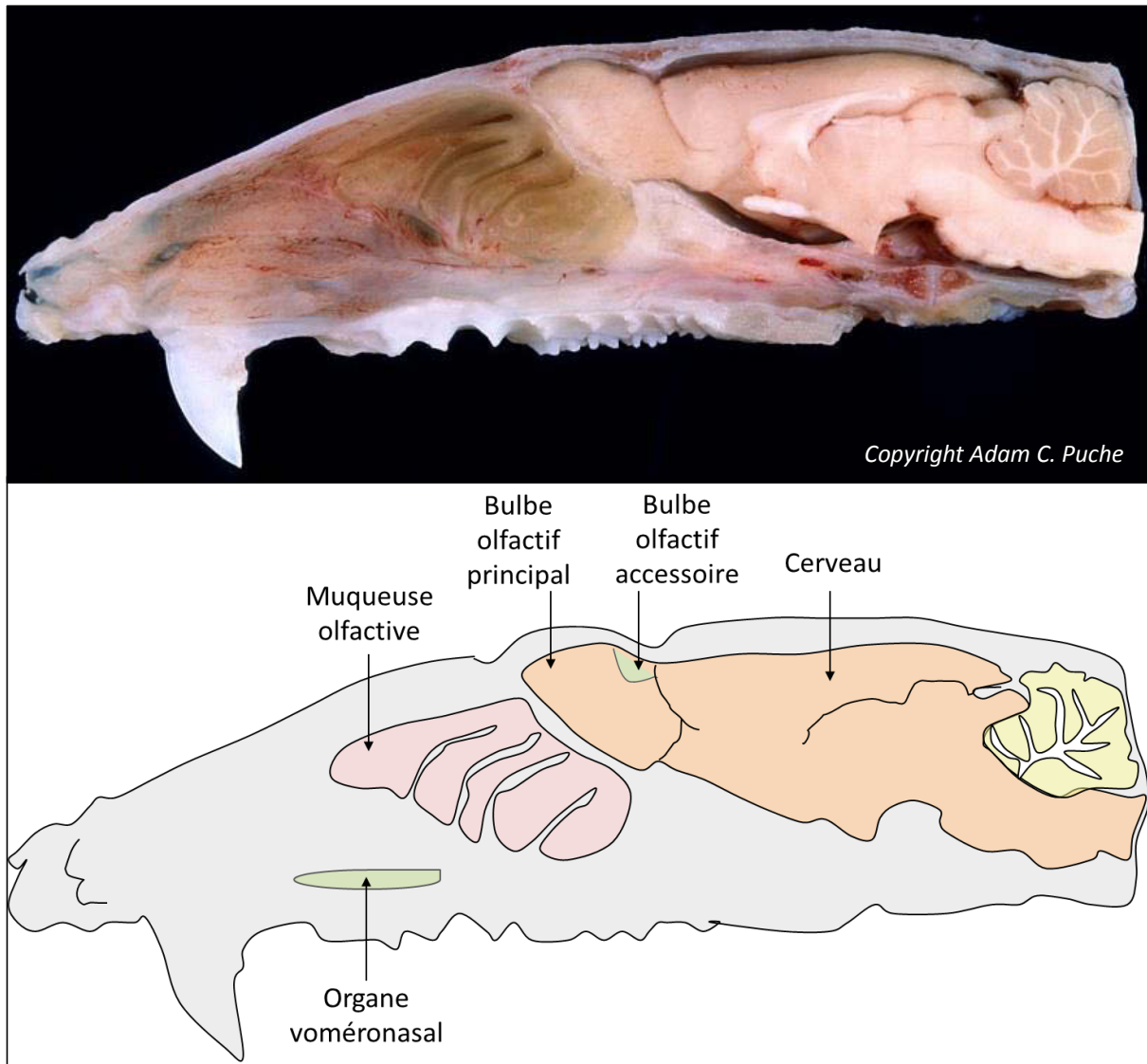
II. Impact de l'état nutritionnel sur le système olfactif

L'évaluation hédonique d'un aliment, *via* l'olfaction, participe, conjointement avec le système de l'homéostasie énergétique, à la régulation de la prise alimentaire. Cette régulation olfactive de la prise alimentaire implique un impact de l'olfaction sur la motivation à initier ou stopper la consommation d'un aliment (valence hédonique de l'aliment) et réciproquement, un impact de l'état métabolique sur la détection et la perception des odeurs alimentaires par le système olfactif. L'identification des réseaux neuronaux du cerveau impliqués dans cette interaction a fait l'objet de nombreuses études chez l'homme et chez l'animal (Rolls, 2015), mais reste partiellement comprise. Les différentes études menées par de nombreuses équipes depuis les années 1970, démontrent une augmentation de la sensibilité olfactive en état de jeûne aigu et/ou de restriction alimentaire chronique, alors que la satiété tend à la diminuer (Aimé et al., 2007; Crumpton et al., 1967; Hanci and Altun, 2016; Prud'homme et al., 2009; Stafford and Welbeck, 2011). Les mécanismes sous-tendant ces régulations sont encore mal connus, mais des interactions entre le statut nutritionnel et l'intégration des signaux olfactifs ont été montrées dans différentes composantes du système olfactif, dont une rapide description structurale préalable est nécessaire.

1. Description des circuits neuronaux du système olfactif principal

Les données décrites dans cette partie concerneront principalement le rat, qui est mon modèle d'étude. Toutefois, il est important de préciser que le système olfactif est très conservé au cours de l'évolution ce qui permet de retrouver une organisation et un fonctionnement général comparable de l'insecte à l'homme (Ache and Young, 2005).

Chez les mammifères, les circuits neuronaux du système olfactif régulent une grande variété de réponses comportementales guidées par les odeurs, tels que les comportements liés à la prise alimentaire, aux émotions (par exemple, l'anxiété, la peur, le plaisir), aux fonctions de reproduction (comportements sexuels et maternels), et aux comportements sociaux (reconnaissance des congénères, de la famille, du clan, de l'extérieur) (Doty, 1986). Pour parvenir à cette grande variété



Copyright Adam C. Puche

Figure 8: Présentation du système olfactif des rats

Le système olfactif est composé de deux voies olfactives parallèles, anatomiquement et fonctionnellement distinctes: 1) Le système voméronasal (organe voméronasal et bulbe olfactif accessoire), spécialisé dans la détection des phéromones et impliqué dans la reconnaissance du statut social et sexuel d'autres individus au sein d'une même espèce traitant uniquement des informations provenant de l'organe voméronasal. 2) Le système olfactif principal, constitué d'une muqueuse olfactive dédiée à la détection des molécules odorantes de l'environnement, et connecté au bulbe olfactif principal qui va permettre le traitement de l'information olfactive « environnementale ».

de fonctions, deux voies olfactives parallèles, anatomiquement et fonctionnellement distinctes, sont mises en jeu. D'une part, le système voméronasal, spécialisé dans la détection des phéromones et impliqué dans la reconnaissance du statut social et sexuel d'autres individus au sein d'une même espèce (Døving and Trotier, 1998). Il est constitué d'un organe voméronasal présentant des neurorécepteurs spécifiques aux phéromones (Rodriguez, 2004), et d'un bulbe olfactif accessoire, traitant uniquement des informations provenant de l'organe voméronasal. D'autre part, le système olfactif principal, constitué d'une muqueuse olfactive (MO) dédiée à la détection des molécules odorantes de l'environnement, et connecté au bulbe olfactif principal (BO) qui va permettre le traitement de l'information olfactive « environnementale » (figure 8). Ma thèse portant sur l'implication de l'état métabolique sur la fonction olfactive générale, nous n'aborderons que le système olfactif principal.

Le système olfactif principal est à l'interface entre l'environnement (*via* la MO, localisée dans la cavité nasale) et le système nerveux central (*via* le BO, localisée à l'intérieur de la boîte crânienne). Son rôle est de coder l'information sensorielle de milliers de stimuli odorants en une information électrique qui sera distribuée dans de nombreuses structures cérébrales.

La MO est composée d'un neuro-épithélium, reposant sur une lame basale, et est constitué de trois types principaux de cellules: des cellules progénitrices qui permettent le renouvellement constant de cet épithélium, des cellules de soutiens et les cellules neuro-réceptrices, c'est-à-dire les neurones olfactifs (NO) (Schwob, 2002) (Figure 9). Pour permettre la détection d'une infinie variété de molécules chimiques volatiles de structures différentes, le système olfactif des rongeurs exprime plus de 1.000 types de récepteurs olfactifs différents, chacun codé par un gène distinct (Buck and Axel, 1991). Les récepteurs olfactifs sont des récepteurs transmembranaires couplés aux protéines G localisés à la surface ciliaire des NO. Chaque récepteur olfactif réagit à une gamme de molécules odorantes qui partagent des caractéristiques moléculaires spécifiques (Malnic et al., 1999). Il est important de préciser que chaque NO de l'épithélium olfactif exprime un seul type de récepteur olfactif et qu'un récepteur donné est porté par environ 10 000 des presque 10 millions de NO présents dans la MO (Chess et al., 1994; Ibarra-Soria et al., 2014; Serizawa et al., 2000).

Le rôle fonctionnel des NO est de transformer le signal chimique porté par les molécules odorantes présentes dans l'air, en un signal électrique. La transduction de ce signal qui va aboutir à la dépolarisation des NO activés est résumée dans (la figure 10). Les potentiels d'actions ainsi générés au niveau du corps cellulaire des NO, se propagent le long de leur unique axone et entraînent la libération de glutamate au niveau de leur terminaison, au sein d'un glomérule situé à la surface du bulbe olfactif (BO).

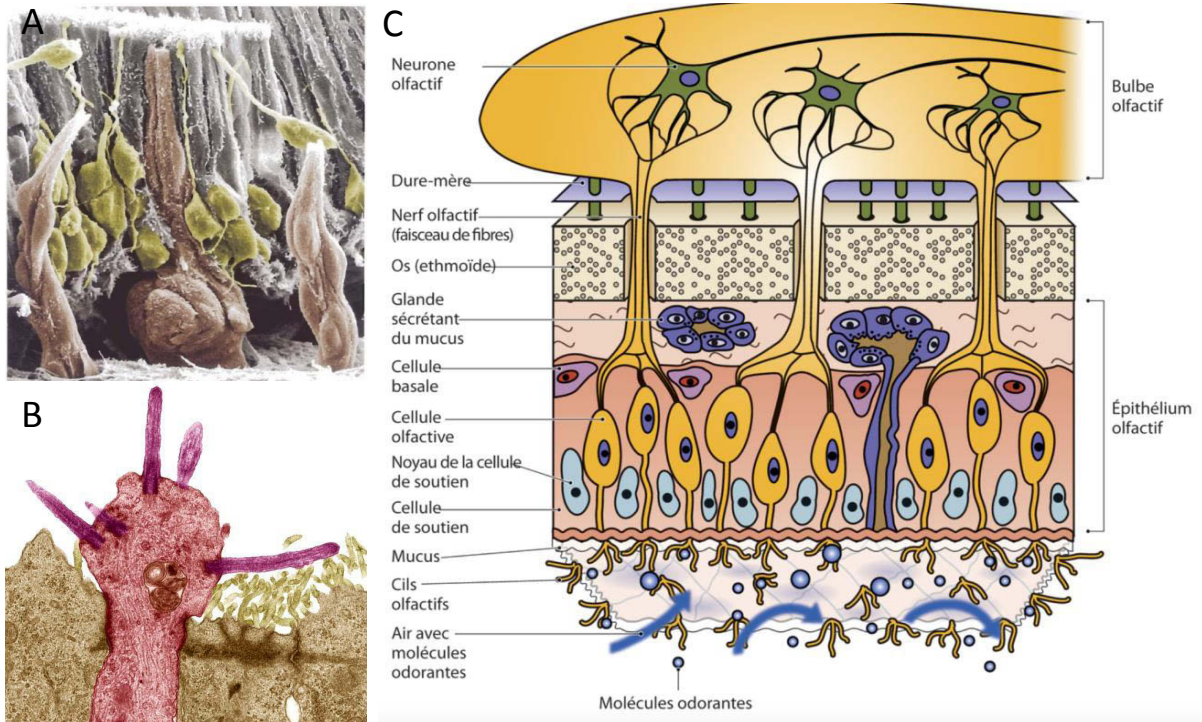


Figure 9: Histologie de l'épithélium olfactif

A: Photographie colorée en microscopie électronique à balayage montrant l'organisation de l'épithélium olfactif. Les somas et les dendrites apicales des neurones olfactifs sont colorés en vert, les cellules de soutiens en gris et les glandes sécrétant le mucus (glandes de Bowman) en marron. D'après Nomura et al., 2004.

B: Photographie colorée en microscopie électronique en transmission (MET), prise à la surface de l'épithélium olfactif, illustrant la présence des cils (en violet) ornant un bouton dendritique(en rose) de neurones olfactifs. Source: MYSTERY OF SMELL - SPL / Agentur Focus

C: Représentation schématique d'une coupe de muqueuse olfactive constituée d'un épithélium olfactif reposant sur une lame basale. L'épithélium olfactif est composée de trois types de cellules : les cellules de soutien (cellules qui entourent et protègent les neurones olfactifs) (en bleu), les neurones olfactifs (neurones olfactifs ciliés qui captent et transmettent l'information olfactive) (en orange) et les cellules basales (cellules qui produisent les neurones olfactifs qui se régénèrent au bout de 4 à 8 semaines). Les glandes de Bowman situées dans la lamina propria sécrètent le mucus qui recouvre l'épithélium olfactif. Les axones des neurones olfactifs, entourés de cellules gliales engainantes, traversent l'os ethmoïde et la dure-mère et se projettent dans les glomérules du bulbe olfactif (BO), 1^{er} site d'intégration du signal olfactif. D'après le manuel de Suzanne Léger, *Apprécier les qualités organoleptiques des aliments*.

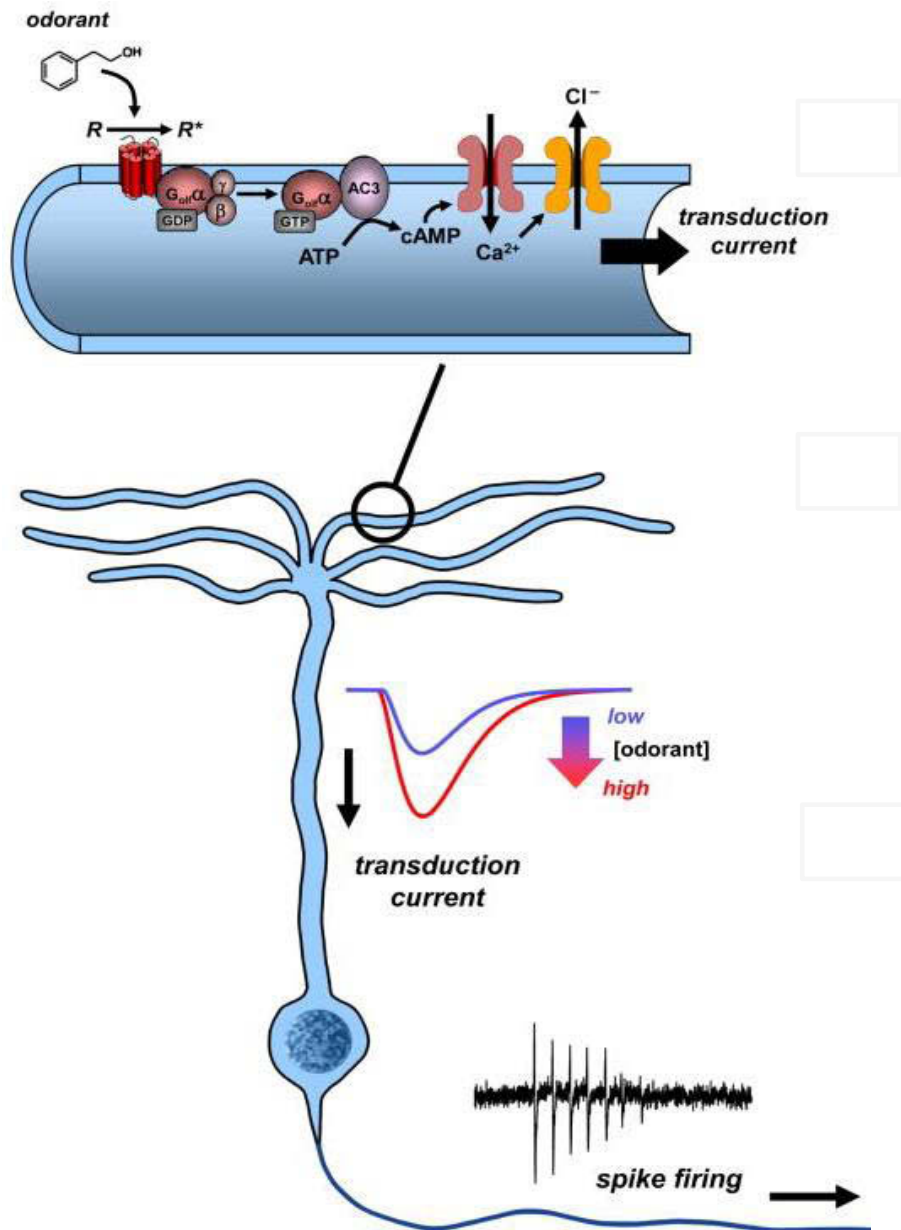


Figure 10: La voie principale de transduction chimio-électrique olfactive (D'après Mainland et al., 2014)

Les molécules odorantes se lient et stabilisent les états actifs des récepteurs olfactifs (R) dans les membranes ciliaires des neurones sensoriels olfactifs (OSN). Les récepteurs activés (R *) se couplent aux protéines G (G_{olf}) et augmentent la synthèse de l'AMP cyclique (AMPc) par l'adénylyl cyclase de type III (AC3). L'AMPc ouvre des canaux sensibles aux nucléotides cycliques qui conduisent des ions calcium dans les cils, qui ouvrent à leur tour un canal (ANO2) assurant la médiation d'un efflux dépolarisant d'ions chlorure. Le courant de transduction dépolarisant résultant est transmis au corps des cellules OSN où il entraîne un potentiels d'action (spike).

(Mainland et al., 2014)

Le BO est constitué de deux héli-bulbes symétriques formant, chez le rongeur, l'extrémité la plus rostrale du système nerveux central. Il est le premier relais central de l'information olfactive. Histologiquement le bulbe olfactif présente une structure laminaire concentrique au sein de laquelle s'individualisent six couches de cellules et de fibres où se font la réception, le traitement et le relais des messages olfactifs, avec de l'extérieur vers l'intérieur : la couche des nerfs olfactifs, la couche glomérulaire, la couche plexiforme externe, la couche des cellules mitrales, la couche plexiforme interne et la couche des cellules granulaires (figure 11).

Au sein du BO, les terminaisons axonales de plusieurs dizaines de milliers de NO qui expriment le même récepteur olfactif convergent vers un à deux glomérules topographiquement spécifiques (Shiple et Ennis, 1996) (Figure 12). En raison de cette convergence axonale des NO, chaque glomérule individuel représente donc un seul type de récepteur olfactif (isorécepteur). De plus, les projections axonales des NO vers le BO sont symétriques entre les deux BO et reproductibles entre individus d'une même espèce (Biju et al., 2008; Ressler et al., 1993; Vassar et al., 1993). Par conséquent la stricte disposition spatiale des glomérules du BO pour chaque molécule odorante permet d'élaborer des cartes olfactives glomérulaires spécifiques, impliquées dans la reconnaissance et la discrimination des odeurs simples (une molécule odorante) ou composées (mélange de plusieurs molécules odorantes) (Mori, 2006; Mori and Sakano, 2011a) (Figure 13).

Chez le rat environ 4200 glomérules d'un diamètre compris entre 80 et 160 μm sont présents et délimités entre eux par les astrocytes et les corps cellulaires des neurones juxta-glomérulaires (Royet et al., 1988). Au sein des glomérules, les axones des NO forment des connexions synaptiques excitatrices sur les dendrites primaires des cellules mitrales et des cellules à panache, qui sont les neurones relais glutamatergiques au sein du BO (Mori, 1987; 2004). Chaque glomérule reçoit les dendrites d'environ 25 cellules mitrales et 50 cellules à panache (Royet et al., 1998; 2004).

Une fois l'information olfactive relayée, les cellules mitrales et les cellules à panaches projettent leurs axones au sein du cortex olfactif (CO) et forment des synapses excitatrices avec les dendrites apicales des cellules pyramidales du CO. Le CO fait partie du système limbique, carrefour des émotions et de la mémoire. Il est divisé en plusieurs zones (Neville et Haberly, 2004). La plus grande d'entre elles est le cortex piriforme, subdivisé en un cortex piriforme antérieur et postérieur. D'autre part, le CO comprend également le pédoncule olfactif qui contient le noyau olfactif antérieur ; le tubercule olfactif ; les noyaux amygdaliens corticaux ; le cortex entorhinal latéral et l'insula agranulaire. Ces aires forment un large réseau fortement interconnecté. Les neurones de ces régions se projettent ensuite sur le thalamus, l'amygdale (qui traite les émotions, agréables ou désagréables), l'hippocampe (impliquée dans l'encodage et le rappel des souvenirs), l'hypothalamus (centre de

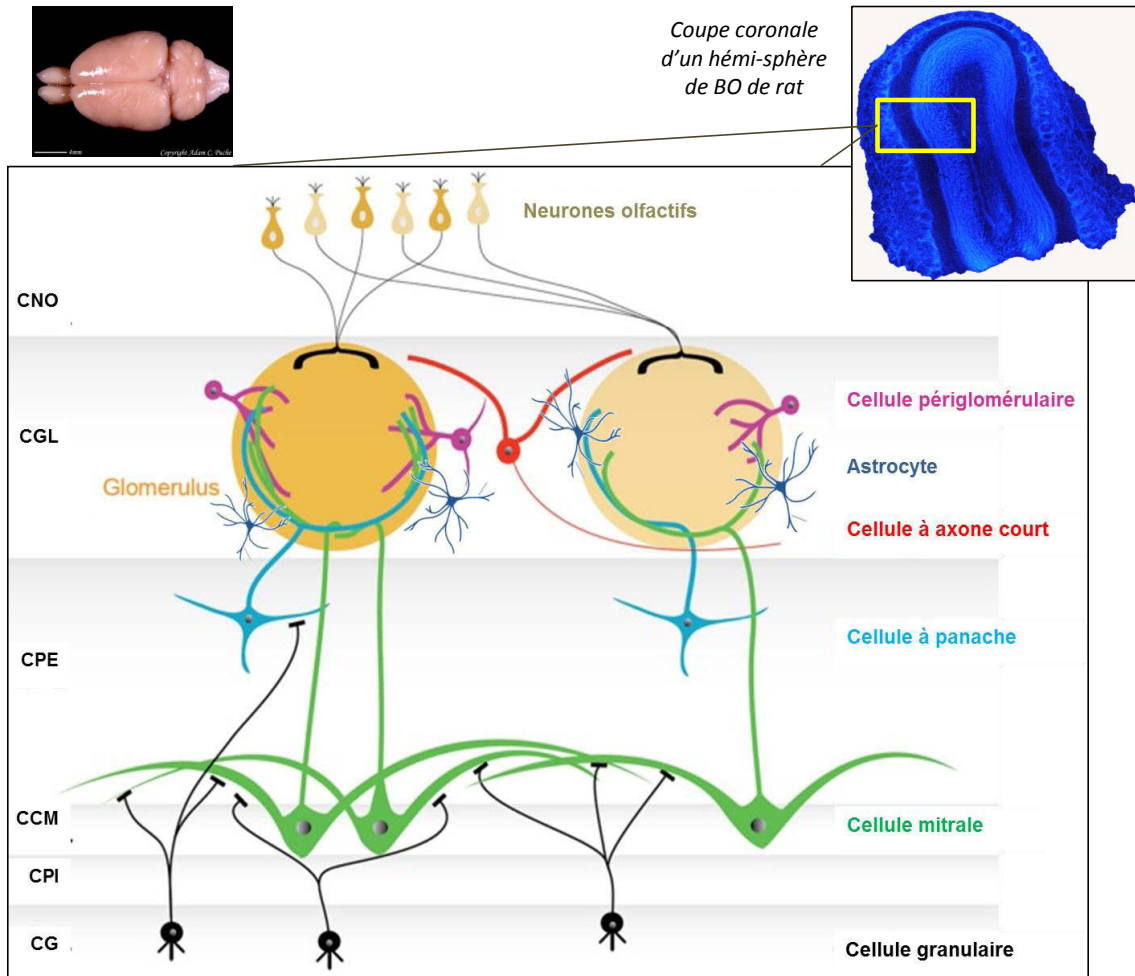


Figure 11: Histologie du bulbe olfactif principal

Le bulbe olfactif (BO) est constitué de deux hémis-bulbes symétriques formant, chez le rongeur, l'extrémité la plus rostrale du système nerveux central (*Photographie d'Adam C. Puche*).

Le BO se décompose en six couches de cellules et de fibres où se font la réception, le traitement et le relais des messages olfactifs vers le reste du SNC.

Les axones des neurones olfactifs font synapses avec les neurones relais du BO, dans la couche glomérulaire (CGL), au niveau des glomérules. Les neurones entourant les glomérules sont appelés les cellules juxtaglomérulaires constitués de trois types de cellules morphologiquement distinctes: les cellules péri-glomérulaires, les cellules externes à panache (non représentées sur ce schéma) et les cellules superficielles à axone court. Il existe deux types de neurones relais: les cellules mitrales et les cellules à panaches, qui envoient leurs axones vers le cortex olfactif. Les corps cellulaires des cellules mitrales sont situés dans la couche des cellules mitrales (CCM), tandis que ceux des cellules à panaches sont dispersés dans l'ensemble de la couche plexiforme externe (CPE). Au niveau de la couche glomérulaire, les cellules mitrales et à panaches forment des synapses réciproques avec les dendrites des cellules péri-glomérulaires (majoritairement inhibitrices).

Abréviation: CNO= Couche des neurones olfactifs; CGL= couche glomérulaire; CPE= couche plexiforme externe; CCM= couche des cellules mitrales; CPI= couche plexiforme interne; CG= couche granulaire.

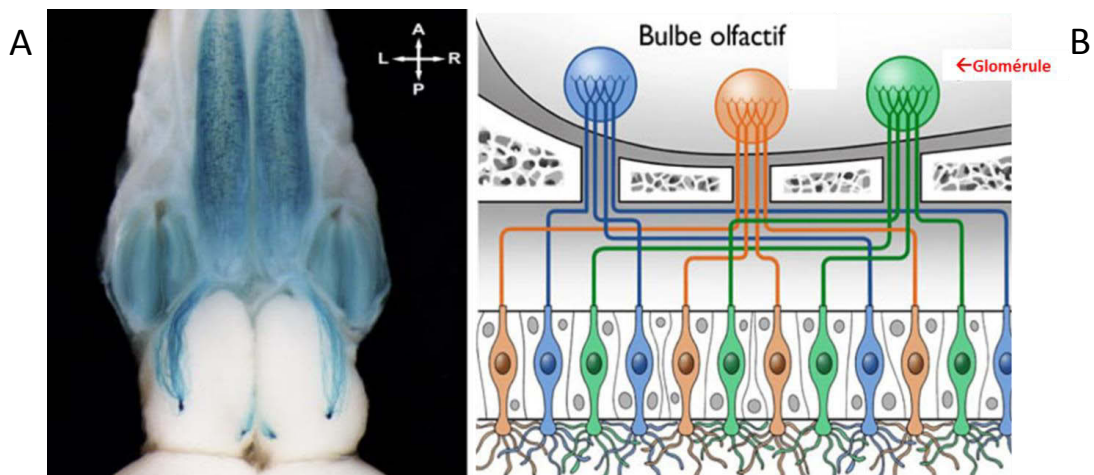


Figure 12: Les connexions épithélio-bulbaires

A: La photographie présente une vue dorsale du système olfactif d'une souris transgénique exprimant la protéine reportrice LacZ sous le contrôle du promoteur du gène codant pour le récepteur moléculaire aux odeurs M72. Les neurorécepteurs olfactifs exprimant M72 (en bleu) sont disséminés sur une grande surface des deux cavités nasales et leurs axones convergent sur une paire de glomérules symétriques, un glomérule médian et un glomérule dorsal, dans chaque bulbe olfactif (D'après Biju 2008). Orientation: A=antérieur, P=postérieur, L=gauche, R=droite.

B: Chaque neurone sensoriel olfactif (OSN) exprime seulement un des ~ 1000 récepteurs odorants. L'ensemble des axones des OSN exprimant un même récepteurs, convergent vers un ou quelques glomérules du bulbe olfactif.

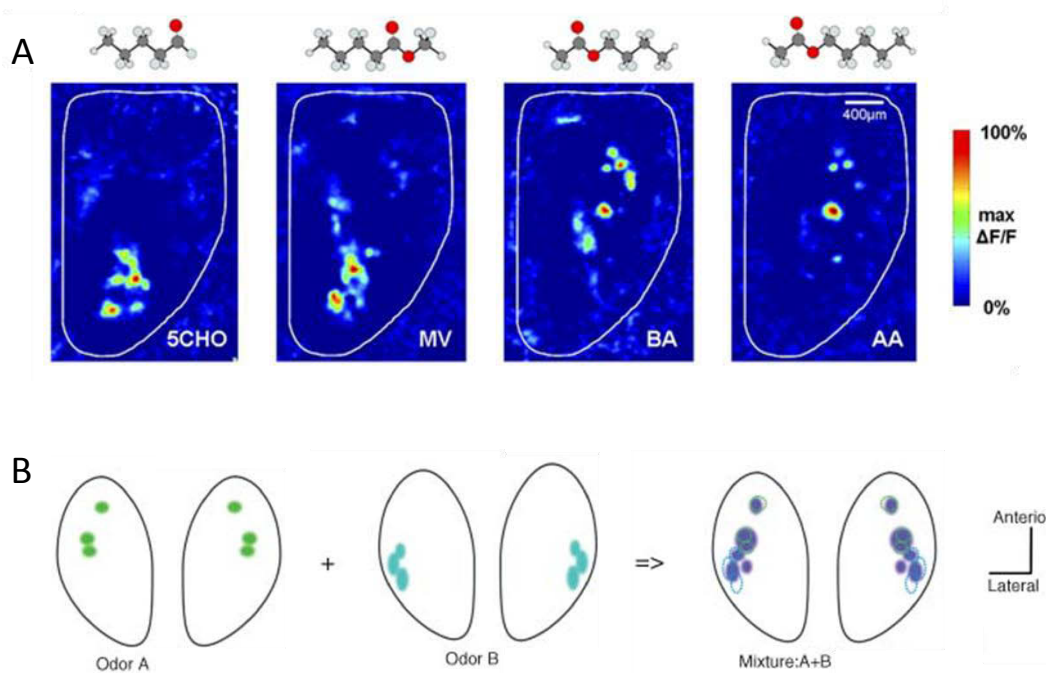


Figure 13: Les cartes olfactives glomérulaires (D'après Max L. Fletcher et al., 2009 et Khan AG et al., 2010)

En raison de la convergence axonale des neurones olfactifs, chaque glomérule individuel représente un seul type de récepteur olfactif. La stricte disposition spatiale des glomérules du BO pour chaque molécule odorante permet d'élaborer des cartes olfactives glomérulaires spécifiques, impliquées dans la reconnaissance et la discrimination des odeurs simples (une molécule odorante) ou composées (mélange de plusieurs molécules odorantes).

A: L'utilisation d'une souris transgénique exprimant une protéine de fluorescence verte sensible au Ca²⁺ + (GCaMP2) sous un promoteur du canal de potassium Kv3.1. permet de visualiser les glomérules activés en réponse à une odeur spécifique, chez un même animal. Les molécules odorantes testées sont : le pentanal (5CHO), le valérate de méthyle (MV), l'acétate de butyle (BA) et l'acétate d'amylole (AA), chacun à 0,5% de vapeur saturée. La structure moléculaire de chaque odorant est affichée au-dessus de chaque carte. (D'après Max L. Fletcher et al., 2009).

B: Schémas en vues de la surface dorsale de l'activité glomérulaire pour l'odeur A, l'odeur B et pour un mélange de A et B. Au niveau des cartes spatiales glomérulaires, la représentation d'un mélange est très proche de la somme topographique des représentations des composants (D'après Khan AG et al., 2010).

contrôle de la prise alimentaire), ainsi que sur le cortex olfactif secondaire constitué des cortex insulaire et orbitofrontal qui traitent l'information olfactive de façon consciente et la relie aux informations gustatives et aux fonctions cognitives (Astic et al., 1993; Barone et al., 1981; Powell et al., 1965; Price et al., 1991) (Figure 14). Le système olfactif se distingue des autres systèmes sensoriels par une double particularité. Premièrement, l'information olfactive atteint le cortex olfactif primaire sans passer préalablement par le thalamus, qui est la structure impliquée dans le transfert et le filtrage des autres informations sensorielles périphériques spécifiques. Deuxièmement, seuls deux ou trois neurones relais séparent les neurorécepteurs olfactifs des régions cérébrales fortement impliquées dans les émotions (amygdale), la mémoire (cortex entorhinal, hippocampe) ou la régulation de la prise alimentaire (hypothalamus). Il existe donc un lien anatomique privilégié entre olfaction, émotion et prise alimentaire. D'une manière générale, toutes les structures cérébrales sur lesquelles se projette le BO, l'innervent en retour. Ainsi le système olfactif et le système de régulation de l'homéostasie énergétique (noyaux hypothalamiques) partagent des voies neuroanatomiques communes et sont connectés réciproquement (de Olmos et al., 1978; Shipley and Adamek, 1984). Le BO est notamment la cible directe de fibres orexinergiques issues de l'hypothalamus latéral (Nambu et al., 1999; Peyron et al., 1998). De même, les cellules pyramidales du noyau olfactif antérieur et du cortex piriforme antérieur projettent massivement leur axone collatéral à l'intérieur du BO exerçant ainsi un rétro-contrôle olfactif. Les axones centrifuges des cellules pyramidales se distribuent principalement dans la couche des cellules granulaires (CG) du BO et terminent sur les interneurons inhibiteurs du BO (Boyd et al., 2012; Luskin and Price, 1983; Markopoulos et al., 2012).

Le circuit neuronal du BO est unique parmi les régions corticales, notamment par le fait que les interneurons inhibiteurs sont plus nombreux que les neurones de projection excitateurs (les cellules mitrales et à panache). Les deux populations les plus abondantes d'interneurones locaux dans le BO sont les cellules granulaires (CG) et les cellules périglomérulaires (CPG) (Mori, 1987). Les CG sont des interneurons inhibiteurs dépourvus d'axone. Leur soma se situe au niveau de la couche des cellules granulaires, alors que leurs dendrites se prolongent dans la couche plexiforme externe et la couche glomérulaire. Ces dendrites forment de nombreux contacts synaptiques avec les dendrites des cellules mitrales et à panache, ainsi qu'avec les terminaisons axonales de fibres centrifuges en provenance d'autres régions cérébrales (Price and Powell, 1970a, 1970b, 1970c). Les CPG sont des interneurons inhibiteurs GABAergiques et dopaminergiques. Ces cellules font parties des cellules juxta-glomérulaires qui délimitent physiquement les glomérules. Leur arborisation dendritique se ramifie, en général, à l'intérieur d'un seul glomérule, et leur axone se termine autour de glomérules adjacents (Hayar, 2004). Au sein des glomérules, les CPG reçoivent une stimulation excitatrice des

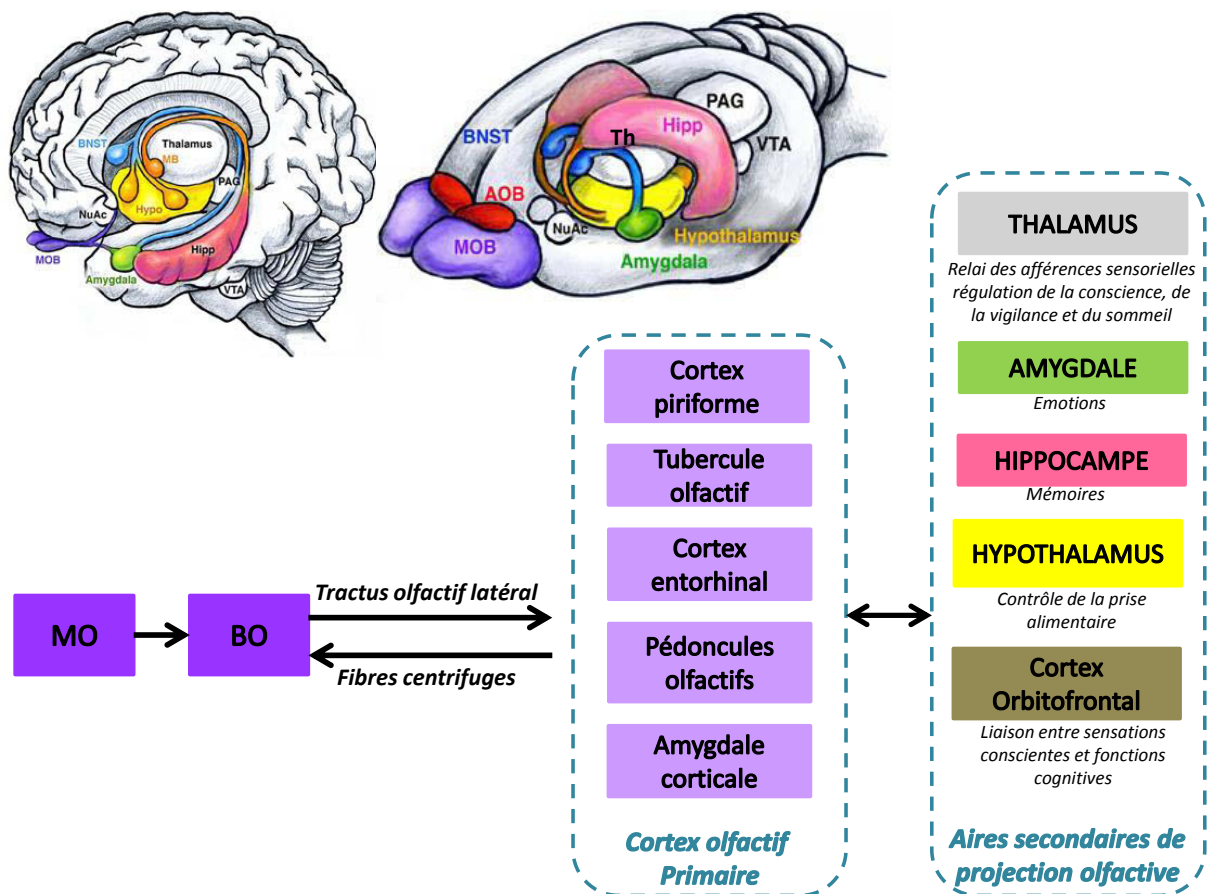


Figure 14: Présentation des différentes zones de projection olfactive

Abréviations: MOB: Bulbe olfactif principal (Main olfactory bulb); AOB: Bulbe olfactif accessoire (Accessory olfactory bulb); BNST: Noyau de la strie terminal (Bed nucleus of the stria terminalis); Th: Thalamus; Hipp: Hippocampe; PAG: La substance grise périaqueducale (Periaqueductal gray); VTA: Aire tegmentaire ventrale (ventral tegmental area) MO: Muqueuse olfactive; BO: Bulbe olfactif.

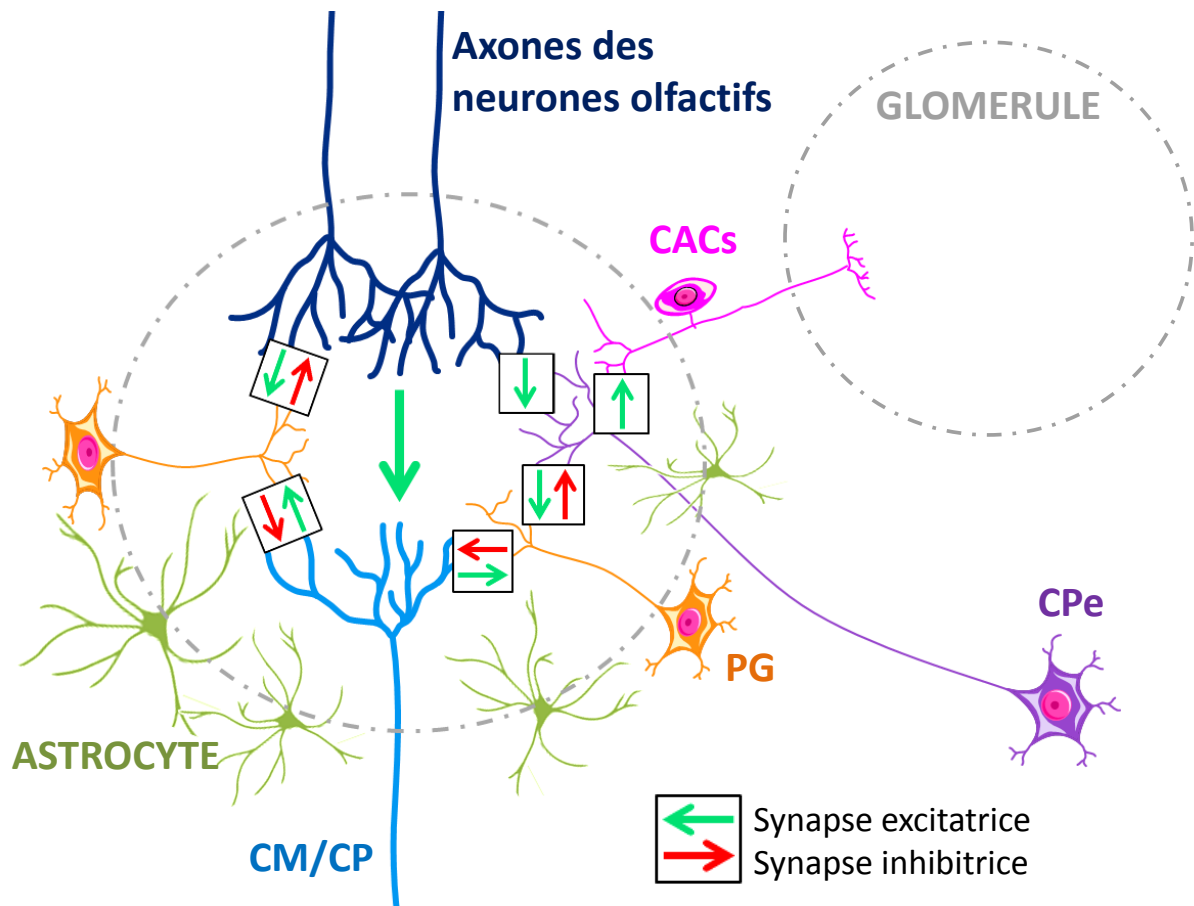


Figure 15: Les interactions synaptiques glomérulaires

Les glomérules (cercles en pointillés gris) sont constitués par les axones des neurones olfactifs qui proviennent de la muqueuse olfactive, les dendrites des neurones relais: les cellules à panache (CP) et les cellules mitrales (CM); et les dendrites des cellules juxta-glomérulaires: les neurones péri-glomérulaires (PG), les neurones à axone court superficielles (CACs) et les neurones à panache externe (CPe). Parmi les cellules juxta-glomérulaires qui délimitent physiquement les glomérules, se trouvent de nombreux astrocytes dont les prolongements entrent au centre des glomérules et viennent directement au contact des nombreuses synapses glomérulaires.

Les synapses excitatrices glutamatergiques sont figurées par des flèches vertes et les synapses inhibitrices GABAergiques et dopaminergiques sont figurées par des flèches rouges.

NO, des cellules mitrales et à panache, et les inhibent en retour via des synapses dendrodendritiques (2004). Ainsi, les CPG modulent l'activité des neurones relais et permettent une inhibition locale (rétro-contrôle) du signal olfactif transmis par les NO (figure 15).

L'ensemble de cette organisation synaptique glomérulaire s'accompagne d'une composante gliale importante, et en particulier d'astrocytes, très présents autour des glomérules et qui projettent leurs prolongements vers le centre du glomérule. Dans ces structures très plastiques, les prolongements astrocytaires et les dendrites des neurones s'entremêlent. Les glomérules, de par leur organisation et fonctionnalité représentent un site potentiel d'intégration des multiples régulations pouvant s'exercer sur la perception olfactive. Pour tenter d'avancer sur les mécanismes qui sous-tendent la relation entre l'olfaction et la prise alimentaire, mon travail de thèse s'est concentré sur les interactions neurones-astrocytes au niveau des glomérules du BO. Un chapitre spécifique sur les interactions neurones-astrocytes dans les glomérules vous sera présenté plus loin dans cette introduction.

2. Impact de l'état nutritionnel sur le système olfactif

a. Influence de l'état nutritionnel sur la perception olfactive

Nous avons vu précédemment que l'olfaction joue un rôle important dans le comportement alimentaire en façonnant notre appétit et nos choix alimentaires. En retour, le système olfactif est modulé par l'état nutritionnel. La faim ou la satiété peuvent influencer la façon dont nous percevons les odeurs (principe de l'alliesthésie) (Jiang et al., 2008 ; Cabanac et Ducleaux 1973). Différentes approches comportementales menées chez l'homme comme chez l'animal, mesurant le seuil de détection, la discrimination, l'identification d'une odeur ou le plaisir qu'elle procure, concluent majoritairement à une augmentation de la sensibilité olfactive en état de jeûne aigu et/ou de restriction alimentaire chronique, alors que la satiété vis-à-vis d'un aliment particulier réduit la capacité de détecter l'odeur spécifique associée à ce type d'aliment (Mulligan et al., 2002; O'Doherty et al., 2000).

Les animaux à jeun ont une plus grande sensibilité olfactive et présentent plus de temps d'exploration pour une odeur alimentaire que ceux qui sont rassasiés (Aimé et al., 2007; Prud'homme et al., 2009). Bien que bien établi pour les animaux (Aimé et al., 2007, Prud'homme et al., 2009), cet effet peut être variable chez l'homme selon la nature de l'odeur ou le statut pondéral (Cameron et al., 2012; Hanci and Altun, 2016; Stafford and Welbeck, 2011). Les individus ayant un index de masse corporelle plus important ont une plus grande acuité olfactive après

rassasiement et ont globalement une sensibilité olfactive plus faible que les individus ayant un faible indice de masse corporelle (Richardson et al., 2004). Dès le début du XXème siècle, les études menées chez l'homme par Glaze et ses collaborateurs montrent pour la première fois une augmentation de sensibilité olfactive à diverses odeurs chez des personnes en période de jeûne ou juste avant un repas (Glaze, 1928). Depuis lors, des résultats discordants ont été rapportés dans la littérature, allant d'une augmentation de l'acuité olfactive en situation de jeûne (Goetzl and Stone, 1947; Goetzl et al., 1950; Hammer, 1951; Kittel and Reitberger, 1970; Ramaekers et al., 2015; Schneider and Wolf, 1955), à aucun changement de sensibilité olfactive (Crumpton et al., 1967; Furchtgott and Friedman, 1960; Janowitz and Grossman, 1949; Koelega, 1994; Zilstorff-Pedersen, 1955). Ceci suggère que ces effets peuvent être subtils, dépendant d'une méthodologie spécifique ou d'un type d'odeur. Cependant, les récentes études à ce sujet, utilisant des techniques de mesure de sensibilité olfactive plus fines, comme le « sniffin Sticks » qui comprend 3 tests olfactifs (seuil, discrimination et identification), concluent majoritairement à l'augmentation de la sensibilité olfactive lorsque les individus sont en situation de jeûne (Hanci and Altun, 2016; Ramaekers et al., 2015; Stafford and Welbeck, 2011)

b. Impact de l'état nutritionnel sur l'activité des neurones du système olfactif

Les mécanismes par lequel l'état métabolique est capable de moduler le fonctionnement des circuits neuronaux du système olfactif ont commencé à être étudiés dans des modèles animaux au début des années 1970. Pager et Giachetti ont été les premiers à mettre en évidence que l'activité électrique des circuits neuronaux du BO est sensible aux changements métaboliques de l'organisme (Pager et al., 1972, Giachetti et al., 1970). Ils ont notamment montré, chez des rats non anesthésiés, que l'activité des cellules mitrales (enregistrées grâce à l'implantation bilatérale et chronique d'électrodes bipolaires) est augmentée lorsque les rats sont mis à jeun (Pager et al., 1972a). Ces auteurs précisent que la modulation de l'activité bulbaire par l'état alimentaire est observée uniquement en réponse à des odeurs alimentaires (et pas à des odeurs neutres comme l'acétate d'amyle). Les modulations observées dans les cellules mitrales sont bloquées par des lésions sélectives des fibres centrifuges (Pager, 1974). Bien que l'identité du mécanisme soit inconnu, encore à l'heure actuelle, les auteurs ont ainsi fourni des preuves solides que l'activité des cellules mitrales est modulée par des facteurs liés à l'état métabolique (Pager et al., 1972a).

Les études électrophysiologiques menées par Pager et Giachetti ont été poursuivies par Apelbaum et Chaput, qui ont montré que l'augmentation de la stimulation des cellules mitrales en réponse à un jeûne est plus faible si les rats sont déjà habitués à un protocole de restriction alimentaire réalisé chaque jour pendant 15 jours (jeûne chronique), par rapport à des rats qui ont été mis à jeun pour la première fois (jeûne aigu) (Apelbaum, 2003). Ces auteurs concluent que le BO est très plastique à des changements de l'état interne et que son activité peut être modifiée par des changements prolongés de l'environnement. Il a depuis été montré au laboratoire, grâce à un marquage d'activité neuronale (gène précoce c-fos), que le jeûne module non seulement l'activité des cellules mitrales mais également, et de la même façon, l'activité des neurones de la couche glomérulaire et de la couche granulaire (Prud'homme et al., 2009). En revanche, ces deux dernières études suggèrent que l'état alimentaire module la réactivité des cellules du BO quelle que soit la nature de l'odeur et non pas uniquement pour des odeurs alimentaires.

A l'heure actuelle, notre compréhension des mécanismes impliqués dans la modulation physiologique des circuits olfactifs par l'état nutritionnel demeure incomplète. Cependant quelques pistes émergent. Parmi elles, le groupe de Masahiro Yamaguchi au Japon, a montré une élimination postprandiale des neurones nouvellement formés dans la couche des cellules granulaires du BO (Yamaguchi et al., 2013; Yokoyama et al., 2011). Une des caractéristiques plastique du système olfactif, est sa capacité à générer continuellement de nouveaux neurones, tout au long de la vie. Ces nouveaux neurones sont soumis à un processus de sélection, conduisant à l'élimination d'un grand nombre d'entre eux par apoptose. Il semble donc que la période post-prandiale contribue fortement à cette sélection neuronale. La même équipe a démontré que le signal moteur de ce processus provient des fibres en provenance du cortex olfactif (Komano-Inoue et al., 2014). Ceci suggère que les signaux de satiété pourraient avoir un impact direct sur la réorganisation des circuits olfactifs, et ainsi moduler le comportement olfactif en relation avec la prise alimentaire.

De nombreux travaux mettent donc en évidence le lien étroit entre les variations métaboliques liées aux états de faim et de satiété et les circuits neuronaux du système olfactif. De ce fait, le système olfactif n'est plus considéré uniquement comme un détecteur de signaux chimiques externes à l'organisme, mais également comme un détecteur parallèle de signaux chimiques internes liés au métabolisme énergétique ((Palouzier-Paulignan et al., 2012b); et voir partie 3) ci-dessous). Si les états métaboliques participent à la modulation du signal olfactif à court- ou moyen-terme autour du repas, leur dérégulation à long-terme dans des situations pathologiques liées à des désordres métaboliques peut également l'influencer (partie 4) ci-dessous).

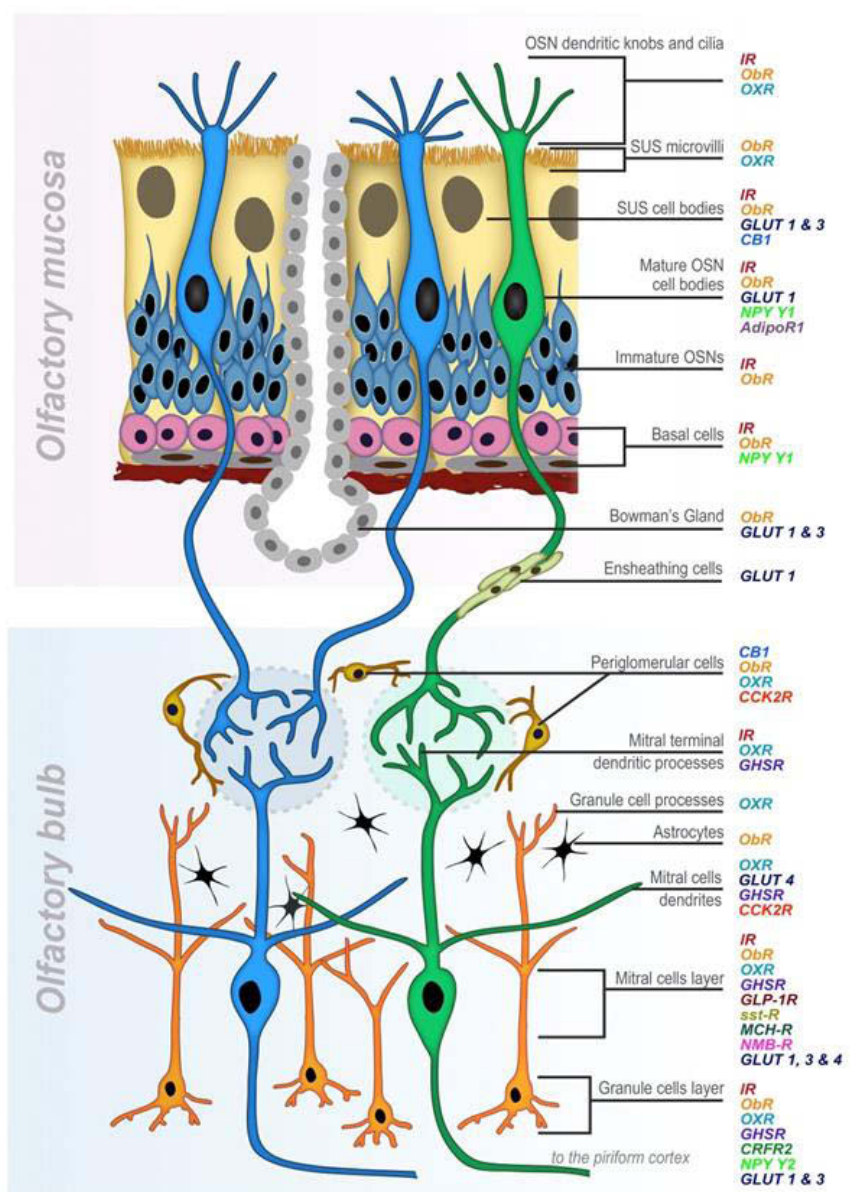


Figure 16: Représentation schématique de l'expression générale des récepteurs hormonaux, peptidiques et énergétiques pour les principaux facteurs métaboliques dans le système olfactif (D'après Palouzier-Paulignan et al., 2012)

La partie supérieure du schéma présente la répartition cellulaire et subcellulaire des récepteurs aux différents facteurs métaboliques, dans la muqueuse olfactive. La partie inférieure du schéma présente cette répartition pour le bulbe olfactif.

Abréviations: OXR: Récepteur de l'orexine; GLUT: transporteur de glucose; CB1: récepteur cannabinoïde 1; SUS: cellules sustentaculaires; NPY Y1: récepteur Y1 du neuropeptide Y; AdipoR: Récepteur de l'adiponectine; CCK2R: récepteur de la cholécystokinine 2; GHSR: récepteur de la ghréline; GLP-1R: récepteur de la protéine du type glucagon-1; sst-R: récepteur de la somatostatine; MCH-R: récepteur de l'hormone de concentration de la mélanine; NMB-R: récepteur de la neuroméline B; CRFR2: récepteur du facteur de libération de la corticotropine-2.

3. Rôle modulateur des peptides orexigènes et anorexigènes sur le système olfactif

L'influence du statut nutritionnel sur le système olfactif passe par l'action des peptides/hormones régulant la prise alimentaire. Les 10 dernières années ont apportées de nouvelles données démontrant que le système olfactif est la cible des peptides orexigènes (ghréline, NPY, orexines et endocannabinoïdes) et anorexigènes (PYY3-36, leptine, insuline) qui reflètent l'état nutritionnel de l'individu et régulent sa prise alimentaire. Plusieurs études menées chez l'animal ont mis en évidence que : 1) ces peptides ainsi que leurs récepteurs sont exprimés dans la muqueuse olfactive et dans le bulbe olfactif ; 2) l'injection de manière systémique ou intra-cérébroventriculaire de ces peptides entraînent des modifications de comportement et/ou du signal olfactif. L'essentiel de ces données ont été récemment résumées dans deux revues (Lucero, 2013; Palouzier-Paulignan et al., 2012b) et sont schématisées dans la figure 16.

a. Impact des peptides et neuropeptides orexigènes sur le système olfactif

En condition de faim ou de jeûne, la sécrétion des peptides et neuropeptides orexigènes (Ghréline, NPY, orexines et endocannabinoïdes) est maximale ce qui permet d'augmenter la prise alimentaire. L'ensemble des données actuelles montrent une augmentation de sensibilité olfactive lorsque ces peptides orexigènes sont injectés chez l'animal ou appliqués directement au niveau du système olfactif. Ces observations soulignent l'importance de l'implication de ces peptides dans la régulation du système olfactif en condition de faim, afin d'augmenter les performances olfactives avant le repas. Ces résultats concordent avec l'idée selon laquelle, dans une situation de faim aiguë, les (neuro)peptides orexigènes impliqués dans l'initiation de la prise alimentaire au niveau hypothalamique, permettraient également d'améliorer la recherche alimentaire en augmentant les performances sensorielles, et plus particulièrement l'olfaction (Tong et al., 2011).

La Ghréline

Des expériences comportementales ont montré que chez l'homme une perfusion systémique de ghréline renforce considérablement l'amplitude de reniflement en réponse aux odeurs (alimentaires ou non), sans affecter l'évaluation hédonique des odeurs (Tong et al., 2011), ainsi qu'une diminution du seuil de détection olfactive chez ces personnes (Trellakis et al., 2011). Chez le rat rassasié, une

injection par voie intracérébroventriculaire de ghréline augmente la sensibilité olfactive et la fréquence exploratoire de reniflement pour une odeur alimentaire (Tong et al., 2011).

Les circuits olfactifs expriment le récepteur de la ghréline (Ghsr-1a) que l'on retrouve notamment au niveau des neurones olfactifs de la MO (Loch et al., 2015), dans la couche glomérulaire, les cellules mitrales et granulaires du BO, ainsi que dans le cortex piriforme (Tong et al., 2011). Ces circuits peuvent donc être directement sous l'influence de la ghréline qui est capable de passer la barrière hémato-encéphalique (Cummings, 2006), cependant les mécanismes d'action de ce peptide restent encore inconnus.

Récemment les travaux de Loch et coll. (2015) ont permis d'avancer sur ces mécanismes. Ils ont montrés que, chez la souris, l'application directe de ghréline dans la cavité nasale induit une augmentation du nombre de neurones olfactifs activés après stimulation par différents odorants, ainsi qu'une augmentation du nombre de neurones péri-glomérulaires activés autour du glomérule correspondant à l'odeur présentée (Loch et al., 2015). Ces données suggèrent que la ghréline induit une augmentation de sensibilité de l'ensemble des neurones olfactifs et accentue la réponse des neurones olfactifs activés par les odeurs.

Les Orexines

Au niveau de la MO, les récepteurs aux orexines (OxRs) sont localisés principalement sur les neurones olfactifs et les cellules de soutiens (Caillol et al., 2003). Leur activation augmente l'amplitude des réponses des neurones olfactifs aux odeurs (EOG ; communication personnelle N. MEUNIER et P. CONGAR). L'étude de Caillol et al. suggère d'ailleurs une synthèse locale d'orexine au niveau de la MO (Caillol et al., 2003; Prud'homme et al., 2009).

Au sein du BO, les signaux des orexines A et B sont associés aux fibres centrifuges orexigéniques provenant de l'hypothalamus latéral et arrivant principalement dans la couche granulaire, autour des glomérules, ainsi que dans la couche des cellules mitrales (Caillol et al., 2003; Hardy et al., 2005; Shibata et al., 2008). L'OxR1 semble être le récepteur dominant au sein du BO (Caillol et al., 2003). Ce récepteur est largement exprimée dans les corps cellulaires et les prolongements des neurones relais, c'est-à-dire des cellules mitrales et des cellules à panaches, et également au niveau des cellules inhibitrices GABAergiques périglomérulaires et granulaires (Palouzier-Paulignan et al., 2012b).

Des tests olfactifs réalisés chez des patients atteints de narcolepsie, qui présentent une perte spécifique des neurones hypothalamiques orexinergiques, montrent que la diminution voire même l'absence anormale d'orexine A dans le liquide céphalorachidien de ces patients entraîne une

altération de leurs fonctions olfactives (seuil de détection, discrimination et identification des odeurs) (Baier et al., 2008). Chez ces personnes, l'administration intra-nasale d'orexine A permet de restaurer les fonctions olfactives. Chez le rongeur, l'administration par voie intracérébroventriculaire d'orexine augmente la sensibilité olfactive des animaux rassasiés, mimant ainsi un état de jeûne (Julliard et al., 2007a). L'augmentation des performances olfactives par les orexines, chez des sujets à jeun, permettrait, comme pour la ghréline, d'améliorer la localisation, l'identification et le choix alimentaire en vue de répondre à un besoin énergétique.

Ces observations comportementales chez les animaux à jeun sont associées à une augmentation de la réactivité (activation c-Fos) des cellules bulbaires et notamment des neurones des couches mitrales et glomérulaires, en réponse aux odeurs alimentaires (Prud'homme et al., 2009). Cet effet est également déclenché par l'injection intracérébroventriculaire d'orexine chez des animaux rassasiés, mimant ainsi une situation de jeûne. A l'inverse, l'administration orale d'antagonistes des récepteurs aux orexines (OxR1 et OxR2) diminue de manière significative le temps d'exploration ainsi que l'activation Fos des cellules bulbaires dans toutes les couches du BO (Prud'homme et al., 2009). Dans l'ensemble, les neurones exprimant l'OxR1 modulent l'excitabilité des cellules mitrales (Apelbaum et al., 2005a; Hardy et al., 2005; Shibata et al., 2008). Dans leur étude, Hardy et al., démontrent d'ailleurs une action double et opposée de l'OXA sur l'activité spontanée des cellules mitrales : une dépolarisation directe des cellules mitrales et une inhibition indirecte de ces mêmes cellules mitrale, *via* une activation des neurones périglomérulaires GABAergiques.

Le NPY

L'analyse des ARNm du NPY indique une production locale du NPY dans le BO et la MO (Blakemore et al., 2006; Won et al., 2000). Le BO à d'ailleurs la particularité de contenir l'un des plus hauts niveaux d'expression d'ARNm du NPY dans le cerveau, qui augmente de façon marquée avec l'âge au cours du développement (Blakemore et al., 2006; Larhammar et al., 1987; Rutkoski et al., 1999). Ce neuropeptide orexigène est donc présent à la fois dans le BO et la MO. Au niveau de cette dernière, l'expression de NPY se situe au niveau des cils des neurones olfactifs, dans les cellules de soutien et dans les cellules engainantes (Jia and Hegg, 2010). Il existe également un faible marquage au niveau du corps cellulaire des neurones olfactifs. Dans le BO, le NPY provient majoritairement de fibres extrinsèques, mais il est également localisé de façon éparsée sur les corps cellulaires des neurones et sur les cellules engainantes dans la couche des nerfs olfactifs et dans la couche glomérulaire (Jia and Hegg, 2010). En ce qui concerne les sources extrinsèques potentielles de NPY, les fibres à NPY qui projettent sur le BO proviendraient du locus coeruleus (Bouna et al., 1994) et très probablement de

l'hypothalamus, cependant, il n'existe pas de données précises sur les connexions hypothalamo-bulbaires.

Parmi les différents récepteurs au NPY, 3 sous-types sont impliqués dans le comportement alimentaire : Y1R, Y2R et Y5R (Beck, 2006). Ils sont présents au niveau du système olfactif et notamment dans un certain nombre de couches bulbaires comprenant la couche glomérulaire, les couches plexiformes externe et interne et la couche des cellules granulaires (Dumont et al., 1996) ainsi que dans certains sous-ensembles de neurones olfactifs et dans les cellules basales de la muqueuse olfactive (Hansel et al., 2001; Negroni et al., 2012).

Les études électrophysiologiques montrent que chez les rats à jeun l'application de NPY dans la cavité nasale augmente les réponses des neurones olfactifs aux odeurs et entraîne une régulation positive d'expression des récepteurs au NPY dans la MO (Doyle et al., 2008; Negroni et al., 2012). De plus, le KO sélectif du récepteur Y1R conduit à une altération modérée mais spécifique, de la fonction olfactive, probablement en raison d'une réduction significative du nombre de neurones olfactifs (Doyle et al., 2008; Hansel et al., 2001), suggérant que le NPY serait un facteur essentiel pour la fonction neuroproliférative de la MO (Doyle et al., 2008; Hansel et al., 2001).

Par ailleurs, l'application d'agonistes des récepteurs NPY sur une préparation de culture primaire de neurones péri-glomérulaires de BO de rat réduit l'activité spontanée excitatrice de certains neurones péri-glomérulaires (essentiellement les neurones péri-glomérulaire à axone court) impliqués notamment dans l'activation des neurones péri-glomérulaires inhibiteurs (GABAergiques) (Blakemore et al., 2006). Dans un contexte *in vivo*, cet effet pourrait entraîner une diminution des régulations inhibitrices qui s'exercent sur les cellules mitrales, entraînant très probablement une augmentation d'activité de ces cellules. Ces observations mettent en évidence l'implication du NPY dans la régulation de la transmission synaptique glomérulaire entre les neurones olfactifs et les neurones relais du BO.

Malgré les nombreuses études du rôle du NPY dans les circuits olfactifs, son implication dans la neurotransmission ou neuro-modulation de l'activité électrique dans le BO en lien avec l'état métabolique demeure encore largement à explorer.

Les Endocannabinoïdes

Au niveau cérébral, le système endocannabinoïde (SEC) est impliqué dans plusieurs processus neurophysiologiques, allant de la régulation du métabolisme énergétique cellulaire à la modulation des fonctions cognitives complexes (Di Marzo, 2008; Piomelli, 2003). De plus, il semble impliqué dans la régulation hédonique de la prise alimentaire notamment parce que l'activation des récepteurs de

ce système est liée à la consommation d'aliments agréables au goût et riches en graisse (DiPatrizio and Simansky, 2008; Higgs et al., 2003; Simiand et al., 1998).

Une étude récente a montré la présence des récepteurs CB1 (et CB2) au niveau de la MO de souris, une localisation en particulier de CB1 dans différents types cellulaires, dont les neurones olfactifs et les cellules progénitrices. Néanmoins, les auteurs n'ont trouvé aucune modulation du signal olfactif par les agonistes CB1, ni de changement dépendant des CB1 chez des animaux mis à jeun (Hutch et al., 2015). Ce résultat est en accord avec l'observation faite en 2012 au laboratoire de l'absence d'effet d'un agoniste CB1 sur les réponses olfactives mesurées dans la MO de rat (EOG ; communication personnelle B. BRYCHE, N. MEUNIER et P. CONGAR).

D'autres études ont cependant mis en évidence une modulation de l'activité olfactive par les endocannabinoïdes dans l'épithélium olfactif des amphibiens (Breunig et al., 2011) et dans le BO des rats (Soria-Gómez et al., 2014; Wang et al., 2012). L'étude de Soria-Gomez et collaborateurs a en particulier montré chez la souris que la faim induit l'activation des récepteurs CB1 exprimés au niveau des terminaisons axonales des neurones centrifuges corticaux glutamatergiques se projetant sur les cellules granulaire du BO. Ce qui a pour conséquence l'augmentation des performances olfactives et de la quantité de nourriture ingérée pendant une période de réalimentation (Soria-Gómez et al., 2014).

Si la contribution du système endocannabinoïde à la régulation du métabolisme énergétique apparaît évidente, son rôle modulateur sur le système olfactif semble plus variable selon les structures.

b. Impact des peptides et neuropeptides anorexigènes sur le système olfactif

En situation de satiété, la sécrétion des peptides et neuropeptides anorexigènes (PYY3-36, leptine, insuline) est maximale ce qui permet d'inhiber, au niveau hypothalamique, la prise alimentaire. L'ensemble des données actuelles montrent une diminution de sensibilité olfactive lorsque ces peptides anorexigènes sont injectés chez l'animal ou appliqués directement au niveau du système olfactif. Ces observations soulignent l'importance de l'implication de ces peptides dans la régulation du système olfactif en condition de satiété entraînant la diminution des performances olfactives après le repas avec pour conséquence de limiter l'intérêt des individus pour les aliments.

La Leptine

La leptine ainsi que les deux principales isoformes de son récepteur (Ob-Ra et Ob-Rb) sont localement exprimés dans les circuits olfactifs, notamment au niveau de la muqueuse olfactive et du bulbe olfactif (principalement la forme longue Ob-Rb observé dans les couches des cellules mitrales et glomérulaires), et sont positivement régulées après une période de jeûne. (Aimé et al., 2012; Badonnel et al., 2009; Baly et al., 2007; Kuczewski et al., 2014; Lacroix et al., 2008).

Plusieurs études réalisées chez le rat ont mis en évidence que la leptine, libérée en condition de satiété, est capable de moduler le comportement olfactif ainsi que l'activité des neurones de la muqueuse olfactive et du bulbe olfactif (Julliard et al., 2007a; Prud'homme et al., 2009; Savigner et al., 2009). La leptine module l'excitabilité et l'activité spontanée des neurones olfactifs, et diminue les réponses aux odorants de ces mêmes neurones (EOG ; Savigner et al., 2009). Par ailleurs, l'injection intra-cérébroventriculaire de leptine chez des animaux mis à jeun pendant 48h (dont le taux de ce peptide anorexigène est physiologiquement bas) entraîne une diminution dose-dépendante de la sensibilité olfactive (Julliard et al., 2007), du temps d'exploration des odeurs de nourriture ainsi que l'activité des cellules péri-glomérulaires, mitrales et granulaires du BO (Prud'Homme et al., 2009). En résumé, l'administration centrale de la leptine chez les rats à jeun permet de mimer un état de satiété.

L'utilisation de souris mutantes, dépourvues de régulation physiologique de la leptine, représente également un modèle pratique pour mieux comprendre le rôle de la signalisation de la leptine dans les comportements olfactifs. Les souris ob/ob (ne produisant plus de leptine), ou db/db (ayant une mutation au niveau du récepteur à la leptine) présentent une augmentation de sensibilité olfactive (tests de nourriture cachée) pour les odeurs alimentaires (Getchell et al., 2006). Cette augmentation est reversée chez les souris ob/ob lorsque les niveaux de leptine sont restaurés par injection intra-péritonéale ; leurs performances olfactives atteignent alors le même niveau que les animaux témoins (Getchell et al., 2006).

La leptine semble donc être un facteur important dans les modulations de sensibilité olfactive par l'état métabolique et notamment dans les processus physiologiques, en particulier sensoriels, permettant d'atténuer et /ou d'inhiber la recherche alimentaire.

L'insuline

Le BO est la région du cerveau ayant le taux de transport d'insuline le plus rapide, la plus forte concentration d'insuline (Baskin et al., 1983) et la densité la plus élevée de son récepteur (Banks et al., 1999; Hill et al., 1986). Au niveau du BO, le récepteur à l'insuline est exprimé dans les

prolongements dendritiques de la couche plexiforme externe, au niveau de la couche glomérulaire (Fadool et al., 2000; Hill et al., 1986; Lacroix et al., 2008; Marks and Fadool, 2007; Marks et al., 2009; Matsumoto and Rhoads, 1990; Werther et al., 1987) et de la couche des cellules granulaires, ainsi que dans les corps cellulaires des cellules mitrales (Marks et al., 2009, 1990). Au niveau de la MO, le récepteur de l'insuline est exprimé par différentes cellules, dont les neurones olfactifs (Lacroix et al., 2008). Dans la MO et le BO, il a été montré une expression locale de l'insuline et une modulation de l'expression de l'insuline et de son récepteur par l'état nutritionnel de l'animal (48h de jeûne induisent une augmentation locale des deux) (Aimé et al., 2012; Badonnel et al., 2009; Baly et al., 2007; Banks et al., 1999; Kuczewski et al., 2014; Lacroix et al., 2008; Tucker et al., 2010).

Les études comportementales concluent majoritairement à une réduction des performances olfactives par l'insuline chez l'homme (Freiherr et al., 2013; Ketterer et al., 2011) et le rat (Aimé et al., 2012; Julliard et al., 2007b; Savigner et al., 2009), après administration d'insuline par voie intranasale, injection icv, ou en situation hyper-insulinémie. Ces observations ont été complétées par des études électrophysiologiques chez le rat qui montrent que l'insuline, comme la leptine, réduit les réponses aux odorants des neurones olfactifs de la MO (Lacroix et al., 2008; Savigner et al., 2009) et module l'excitabilité et l'activité spontanée des neurones olfactifs (Savigner et al., 2009).

Cependant les données comportementales et électrophysiologiques actuelles soutiennent l'idée que l'insuline peut modifier de manière différentielle la détection et la discrimination qualitatives des odeurs, en améliorant ou en altérant les mécanismes olfactifs de manière dépendante aux odeurs et très probablement dépendante de la valence alimentaire de l'odeur dans un contexte d'alimentation (Kuczewski et al., 2014). L'insuline module donc la sensibilité olfactive et les comportements liés à la recherche alimentaire. Les mécanismes par lesquels l'insuline affecte la perception olfactive ne sont pas encore clairs. Des études *in vitro* montrent que l'action de l'insuline sur les cellules mitrales passerait par une phosphorylation des canaux Kv1.3, diminuant ainsi leur activité (Fadool and Levitan, 1998; Fadool et al., 2000, 2011).

Le PYY 3-36

Très peu de données concernant l'étude du PYY3-36 au niveau du bulbe olfactif existent dans la littérature. L'expression de PYY 3-36 a été rapportée comme étant restreinte aux cellules de soutien, même si, de manière tout à fait intéressante, une délétion ciblée de ce peptide entraîne une augmentation du nombre de neurones olfactifs et donc pourrait jouer un rôle dans la différenciation neuronale (Doyle et al., 2012). Le récepteur Y2 est principalement exprimé dans le noyau olfactif antérieur et, dans une moindre mesure, au niveau de la couche des cellules granulaires du BO (Stanić et al., 2006).

c. Influence du glucose sur les circuits olfactifs

Le glucose est une source d'énergie essentielle nécessaire au fonctionnement des cellules cérébrales (neurones et astrocytes). Des modifications de la glycémie entraînent une modification de plusieurs processus physiologiques incluant le comportement de recherche alimentaire et l'olfaction. Les structures olfactives sont sensibles aux variations de glucose périphérique (Delaere et al., 2013). Récemment, il a été montré que certains neurones du BO, et notamment les cellules mitrales, détectent et répondent au glucose de manière similaire aux neurones hypothalamiques (Tucker et al., 2010). Cependant, les mécanismes moléculaires précis régissant la détection du glucose dans le BO sont encore en cours d'étude.

La glycémie chez le rat varie de 10mM, pour des animaux rassasiés, à 6.2mM, pour des animaux en situation de jeûne. Les études de Koborssy et al. montrent que la concentration du glucose dans les fluides extracellulaires (ECF) du BO fluctue entre 0.7mM à 2.5Mm et est ainsi plus élevée que dans le cortex. Les fortes concentrations de glucose dans l'ECF du BO coïncide avec les propriétés particulières du BO: une haut densité de réseaux capillaires, notamment au niveau des glomérules (Chaigneau et al., 2007), ainsi qu'une haute perméabilité de la barrière hématoencéphalique (Ueno et al., 1996). La concentration métabolique du glucose à l'équilibre dans le BO est indépendante de l'état nutritionnel (comme dans le cortex), en revanche des changements aigus des conditions glycémiques peuvent affecter la concentration de glucose bulbaire (Aimé et al., 2014; Al Koborssy et al., 2014a).

Plusieurs transporteurs du glucose insulino-dépendant comme GLUT1 (astrocytaires), GLUT3 et GLUT4 (neuronaux) ou transporteurs couplés au sodium comme SGLT1, sont présents dans le système olfactif (MO et BO), et ont été décrits notamment dans la couche des cellules mitrales et la couche glomérulaire, et, dans une moindre mesure, dans la couche des cellules granulaires (Al Koborssy et al., 2014a; Choeiri et al., 2002; El Messari et al., 1998; Leloup et al., 1996). L'insuline, connue pour activer la translocation de GLUT4 vers la membrane plasmique (McEwen and Reagan, 2004), est très présente dans l'OB comme nous l'avons vu précédemment, et son récepteur s'exprime principalement dans les couches glomérulaires et des cellules mitrales (Aimé et al., 2012). Koborssy et al., 2014, ont montré que l'expression et la localisation de GLUT4 sont dépendantes de l'état nutritionnel, contrairement à SGLT-1. Les rats rassasiés ont ainsi une augmentation de GLUT4 au niveau de la membrane des neurones, correspondant à l'augmentation de la glycémie et des niveaux d'insuline circulant, alors que les rats à jeun ont une localisation de ce transporteur principalement au niveau du cytoplasme (Al Koborssy et al., 2014a).

Les cellules mitrales sont sensibles aux variations des concentrations de glucose, une réponse qui est très rapide (Tucker et al., 2010). Des études récentes de patch-clamps montrent que les cellules mitrales changent leur taux de décharge de potentiel d'action en réponse aux changements de concentration de glucose circulant, soulignant la pertinence de ces cellules pour le traitement des changements physiologiques normaux du glucose (Tucker et al., 2010, 2013b). Le travail de Tucker a permis d'identifier ces neurones comme des capteurs de glucose dans le BO.

Ces données fournissent de nouvelles preuves d'une relation directe entre le BO et le métabolisme périphérique, et mettent l'accent sur l'importance du glucose dans les circuits olfactifs, fournissant des arguments solides pour établir que le BO est un organe de détection du glucose à part entière.

Globalement, ces données montrent que les premiers niveaux de traitement du signal olfactif, MO et BO, sont capables d'intégrer une information nutritionnelle à court terme et d'y répondre en modulant le signal olfactif.

4. Impact des pathologies liées à des perturbations métaboliques sur le système olfactif

Obésité

Chez l'homme, le dysfonctionnement olfactif est un facteur pouvant contribuer au progrès de l'obésité (Richardson et al., 2004). Cependant, le nombre d'études menées chez l'homme à ce sujet reste aujourd'hui très limité. Nous pouvons néanmoins relever que la majorité des études de cohortes ont montré que l'obésité morbide, chez l'adulte comme chez l'enfant, est corrélée à une diminution de la capacité de détection et d'identification olfactive, même lorsque les sujets sont en situation de jeûne (Fernández-Aranda et al., 2016; Richardson et al., 2004). Chez les personnes ayant une obésité non-morbide, la sensibilité olfactive ne semble pas diminuée, et peut même être augmentée (Islam et al., 2015).

Afin de mimer l'obésité rencontrée dans les populations humaines, résultant le plus souvent d'une alimentation déséquilibrée, Thiebaud et al. (2014) ont récemment montré que des souris rendues obèses par une alimentation chronique riche en matière grasse ont une perte d'environ 50% de leurs neurones olfactifs et de leurs projections axonales. De plus, chez ces souris le déficit structurel massif au sein des circuits neuronaux olfactifs s'accompagne d'une insuffisance dans la discrimination et l'apprentissage olfactif. Cette insuffisance persiste même après retour à un phénotype normal (arrêt du régime riche obésogène). Un déséquilibre chronique de la balance énergétique semble donc induire des changements structuraux et fonctionnels à long terme dans le système olfactif et altérer durablement les comportements olfactifs (Thiebaud et al., 2014). Ces effets ont également été

confirmés chez le rat par des travaux réalisés au laboratoire. Des rats Sprague-Dawley génétiquement sensibles à l'obésité et rendus obèses par une alimentation chronique riche en graisses et en sucre présentent (comparativement aux rats Sprague-Dawley résistant à l'obésité et ayant un apport alimentaire normal) une diminution de sensibilité et de performances olfactives associés à des déficits d'apprentissage et de mémoire. Ces modifications comportementales sont également associées à des modifications dans les circuits olfactifs générées par des perturbations d'expressions, au niveau de la MO et du BO, de certains récepteurs ou transporteurs liés au métabolisme énergétique (récepteurs à l'insuline, récepteurs aux glucocorticoïdes, transporteurs du glucose ...) et impliqués dans la régulation du signal olfactif, la dynamique cellulaire et l'homéostasie de la MO et du BO (Lacroix et al., 2015).

L'ensemble de ces études montrent des effets drastiques de l'obésité sur les circuits olfactifs. Ces données sont à préciser, en particulier pour définir si les troubles olfactifs observés sont à classer dans les causes ou les conséquences de l'obésité et de la dérégulation de la prise alimentaire qui l'accompagnent.

Diabète

Chez l'homme, le diabète est associé à une diminution des performances olfactives traduit par une augmentation du seuil de détection et une diminution de la capacité d'identification et de discrimination des odeurs, conduisant à un risque plus grand de développer une anosmie (Lacroix et al. 2016) (Brady et al., 2013; Gouveri et al., 2014; Naka et al., 2010; Palouzier-Paulignan et al., 2012b). De même, une étude récente sur un modèle de souris rendues diabétiques par un régime enrichi en fructose met en évidence des fonctions olfactives altérées et une diminution de l'amplitude des réponses olfactives des neurones de la MO (Rivière et al., 2016).

Anorexie

La plupart des études réalisées sur des personnes anorexiques montrent une altération de leur seuil de détection, de discrimination et d'identification ainsi qu'une modification de la valeur hédonique des odeurs (Palouzier-Paulignan et al. 2012 ; Lacroix MC, et al. 2016). Cependant une étude menée par Fernandez-Aranda et coll. (Fernández-Aranda et al., 2016) rapporte des performances et capacités olfactives plus élevées chez les personnes anorexiques. Tous ces résultats restent néanmoins assez discutés, comme le souligne une méta-analyse menée en 2015 à ce sujet (Islam et al., 2015).

L'ensemble de ces études suggère clairement que les troubles métaboliques associés à l'obésité, le diabète ou l'anorexie, peuvent induire des modifications olfactives au niveau comportemental et

fonctionnel, affectant la détection, la reconnaissance ou la discrimination olfactive. Le système olfactif est donc sensible aux changements à court terme de l'état prandial ainsi qu'aux dérégulations métaboliques à court, moyen ou long-terme. Une dérégulation précoce du lien entre l'état métabolique et la fonction olfactive pourrait participer à l'initiation de la dérégulation progressive de la prise alimentaire associée aux désordres métaboliques, et/ou contribuer à son aggravation.

Les preuves convergentes démontrent que le système olfactif est une cible pour les hormones liées à la régulation du métabolisme et de la prise alimentaire, qui adapte sa fonction aux besoins nutritionnels en favorisant ou en inhibant la recherche de nourriture. En revanche peu de mécanismes ont été clairement établis pour expliquer comment l'état métabolique est perçu et intégré par le système olfactif qui, en réponse, est capable de moduler son seuil de sensibilité. Ce travail de thèse a pour objectif d'avancer sur la compréhension de ces mécanismes en ciblant les interactions neurones-astrocytes au sein des glomérules du BO. Dans ces structures très plastiques, essentielles pour la transmission du signal olfactif vers les aires cérébrales plus profondes, les prolongements astrocytaires, très abondants, s'entremêlent avec les axones des neurones sensoriels et les dendrites des neurones du BO. Cette zone d'interactions constitue un site potentiel d'intégration des multiples régulations s'exerçant sur l'information olfactive (métaboliques, émotionnelles, cognitives...). Le rôle des astrocytes y est souligné par quelques travaux récents (Martin et al., 2012; Roux et al., 2011) et mérite d'être approfondi. Les astrocytes sont aujourd'hui reconnus comme des partenaires à part entière de la synapse (Halassa et al., 2007a) et sont considérés comme des méta-régulateurs de la neurotransmission dans le système nerveux central, notamment en coordonnant des réseaux neuronaux en réponse à des stimuli hormonaux et environnementaux (Min et al., 2012). Ainsi, l'interaction neurones-astrocytes au sein des glomérules pourrait être un support de la régulation de la sensibilité olfactive par l'état nutritionnel.

III. Les astrocytes

1. Présentation générale

Les astrocytes sont les cellules gliales les plus abondantes au sein du cerveau humain. Leurs corps en forme d'étoile ont de nombreux prolongements qui entourent les synapses et les vaisseaux sanguins. Au cours des dernières années, il a été largement démontré que les astrocytes ont un rôle beaucoup plus important dans le fonctionnement du cerveau que le seul rôle de soutien aux neurones qui leur était attribué initialement. Ils sont reconnus comme des partenaires actifs dans la communication synaptique au sein du cerveau. Une compréhension complète du fonctionnement du cerveau passe désormais aussi par celle des interactions astrocyte-neurone (Araque et al., 2014; Volterra and Meldolesi, 2005)

Les cellules gliales représentent près de 90% des cellules du SNC. Les astrocytes sont la principale population de ces cellules dans le cerveau des vertébrés, et leur nombre augmente dans la phylogénie avec la complexité croissante du SNC. Ils doivent leur nom à Michael Von Lenhossek, en raison de leur morphologie étoilée. Ils participent à un certain nombre d'interactions qui sont au cœur du développement, des fonctions, et de la réparation du SNC. Il existe quelques différences visibles entre les astrocytes de rongeurs et humains, comme par exemple le rapport de la glie aux neurones qui au sein du cortex humain est d'environ 1.65, alors que chez les rongeurs, ce ratio est proche de 0,3 (Nedergaard et al., 2003; Sherwood et al., 2006). Par ailleurs un seul astrocyte approche 20 à 120 mille synapses dans le cerveau des rongeurs, et environ 270 mille à 2 millions de synapses dans le cerveau humain (Bushong et al., 2004a; Oberheim et al., 2006, 2009). Cependant l'état actuel des connaissances donne une portée raisonnable à l'extrapolation de la physiologie astrogliale des animaux expérimentaux (principalement des rongeurs) aux humains (Heller and Rusakov, 2015).

Chez les rongeurs, on distingue des astrocytes fibreux et protoplasmiques (Gallo and Deneen, 2014; Rodnight and Gottfried, 2013). Les astrocytes fibreux sont situés dans la matière blanche, leurs prolongements sont longs et peu ramifiés (Andriezen, 1893; Giaume and McCarthy, 1996) et leur rôle est de favoriser la myélinisation des axones en interagissant avec les oligodendrocytes (Lundgaard et al., 2015; Molofsky et al., 2012). Les astrocytes protoplasmiques se trouvent dans la matière grise, leurs prolongements sont courts et arborisés et ils se situent principalement à

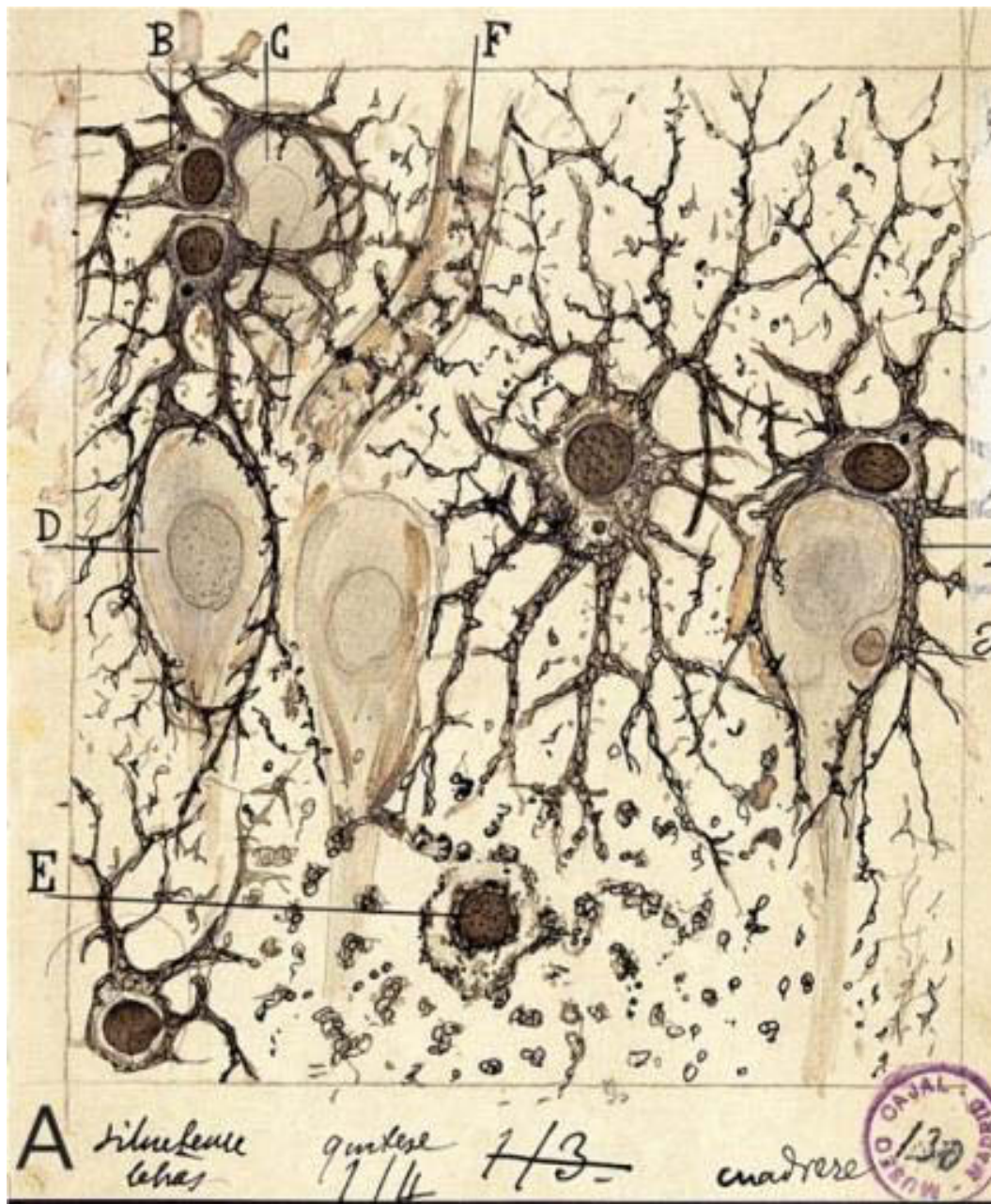


Figure 17: Dessin d'astrocytes de Ramon y Cajal, 1897

En utilisant des approches histologiques de base, Cajal observe que les astrocytes protoplasmiques (cellules sombres) possèdent un soma relativement petit et plusieurs prolongements épais dont les extrémités distales enlacent les somas neuronaux et les dendrites voisins. (Ramon y Cajal, 1897).

proximité des synapses neuronales et des vaisseaux sanguins. Ma thèse se concentre uniquement sur ce type d'astrocytes.

La diversité morphologique des astrocytes a été appréciée pour la première fois dans les dessins de Ramon y Cajal (Ramón y Cajal S., 1897) réalisés à partir de coupes provenant du néocortex traitées avec une coloration de particules d'or permettant de visualiser les filaments intermédiaires des astrocytes (Ramón y Cajal, 1909) (Figure 17)

Nous savons maintenant que ces filaments se composent principalement de la protéine acide fibrillaire gliale (GFAP). Le marquage ciblé de la GFAP, constitue la caractéristique cytologique la plus utilisée pour détecter et identifier les astrocytes (McLendon and Bigner, 1994; Pekny et al., 1995; Sofroniew and Vinters, 2010). Cependant le marquage des astrocytes par la GFAP doit être interprété avec prudence, car il ne représente que partiellement la morphologie complexe des cellules astrocytaires. En effet les astrocytes possèdent de très fins prolongements distaux, les PAPs (Peripheral Astrocytic Processes) qui sont les compartiments astrocytaires en contact avec les synapses (figure 18). Ils contiennent peu de cytoplasme et sont dépourvus d'organites intracellulaires, y compris de filaments intermédiaires, et donc de GFAP. Les prolongements astrocytaires contenant la GFAP comme constituant principal représentent environ 15% du volume total d'un astrocyte (Bushong et al., 2004a) alors que les PAPs représentent 70-80% de la membrane plasmique des astrocytes (Wolff, 1970) et se trouvent au niveau d'environ 60% des synapses dans le cerveau. Leur présence au niveau des synapses peut varier considérablement d'une structure cérébrale à une autre. Il a été estimé qu'un seul astrocyte est capable d'envelopper 4-8 soma neuronaux et 300-600 dendrites (Halassa et al., 2007b). De nombreuses études expérimentales suggèrent que le recouvrement astroglial au niveau synaptique est dynamique et peut être influencé par l'état physiologique de l'animal, l'activité neuronale locale, l'induction de la plasticité synaptique, ou par certains comportements (Heller and Rusakov, 2015).

Ramon y Cajal (Ramón y Cajal, 1909) avait déjà remarqué la grande complexité des prolongements astrocytaires ainsi que leur relation étroite avec les éléments neuronaux et vasculaires. Il a aussi observé qu'il y avait très peu de chevauchement entre les prolongements distaux de deux astrocytes adjacents suggérant que les cellules gliales individuelles délimitent des domaines distincts. Les astrocytes, organisés en réseau, sont reliés entre eux grâce à des jonctions communicantes (Giaume, 2010). Ces jonctions constituent des canaux entre cellules adjacentes formés par l'alignement de 2 héli-canaux comportant chacun 6 unités de connexines dont les principales sont les connexines 43 et 30. Ces canaux permettent l'échange, entre cellules, d'ions, mais également de petites molécules comme le glucose et ses métabolites (Escartin and Rouach, 2013; Rouach et al., 2008).

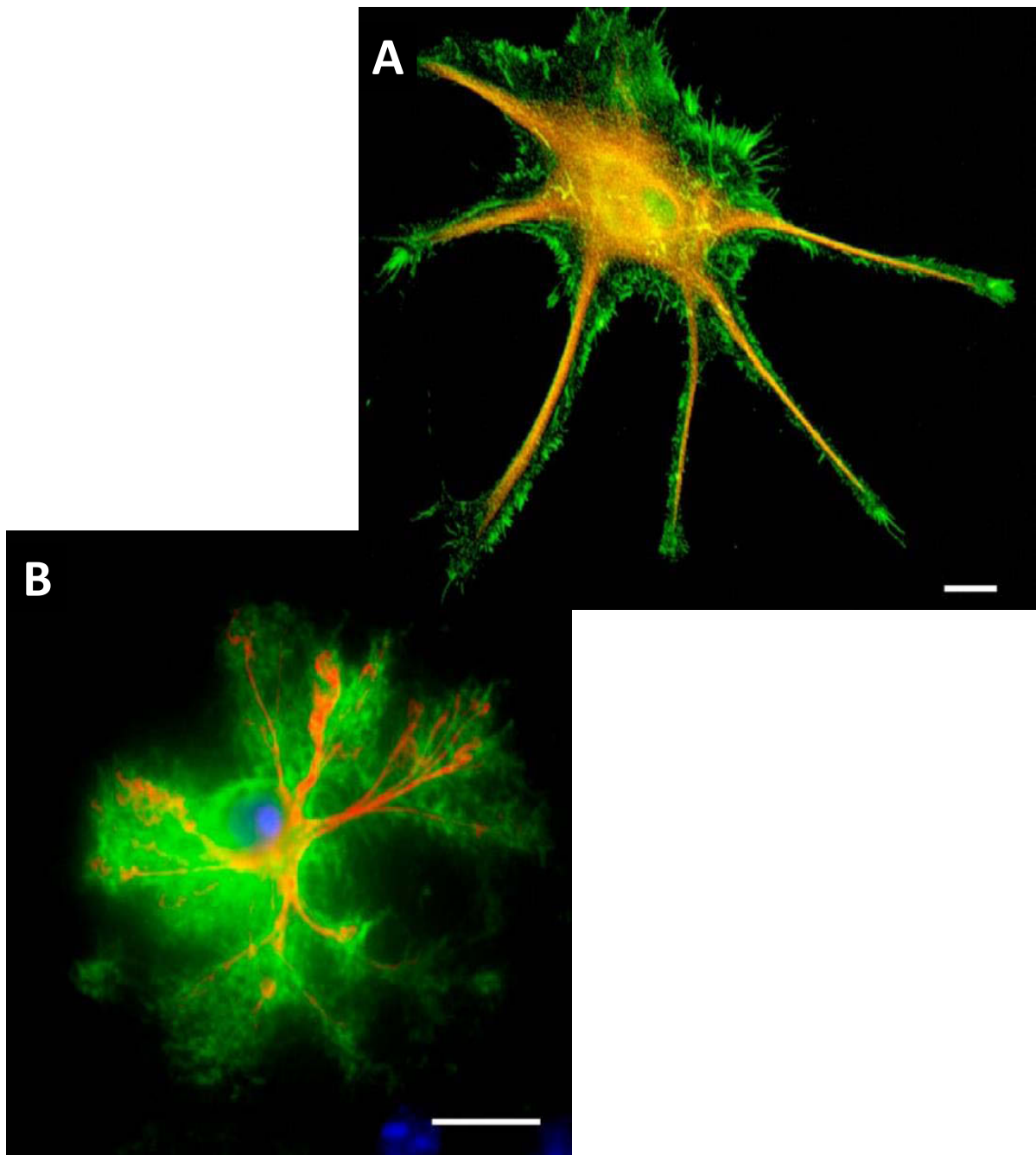


Figure 18: Les prolongements péri-synaptiques astrocytaires (*Adapté de Reichenbach et al., 2010*)

Co-marquage immunohistochimique de la GFAP et de l'ézrine permettant de distinguer les principaux prolongements astrocytaires (GFAP) et les fins prolongements péri-synaptiques: les PAPs (ezrine), dépourvus de GFAP.

A= astrocyte en culture; B= astrocyte isolé sur tranche. Barre d'échelle en μm : 10 (A) 15 (B).

Cette organisation spécifique des astrocytes en réseau est indispensable à leur fonctionnalité et plus globalement à la régulation de la neurotransmission et de la plasticité synaptique (Pannasch et al., 2011).

Les astrocytes peuvent détecter l'activité neuronale grâce une riche panoplie de récepteurs, de transporteurs et de canaux ioniques qui s'accumulent dans leurs fins prolongements (Araque et al., 1999; Verkhratsky et al., 1998). Des récepteurs leur permettent notamment de détecter et de répondre aux neurotransmetteurs ou autres signaux libérés au niveau des synapses par des élévations transitoires de calcium cytosolique (Verkhratsky et al., 1998). Cette réponse calcique résulte de la libération de calcium au niveau de stocks internes de calcium et peut se transformer en « vagues » calciques qui se propagent aux astrocytes voisins, en transférant ainsi le signal à distance de son site d'origine à travers le réseau astrocytaire. La propagation intercellulaire de vagues calciques permet, entre autre, la coordination de synapses distantes (Cornell-Bell et al., 1990).

La signalisation calcique astrocytaire, souvent liée à l'activité synaptique, joue un rôle central au niveau neuronal, synaptique et astrocytaire. Elle modifie l'expression de certains gènes astrocytaires et notamment le niveau d'expression des transporteurs astrocytaires du glutamate (Devaraju et al., 2013). Elle permet aux astrocytes de moduler localement le tonus microvasculaire (Haydon, 2006) et participe aux mécanismes de couplage neuro-métabolique (Bernardinelli et al., 2004; Porras et al., 2008). D'autre part, la signalisation calcique permet aux astrocytes de libérer des gliotransmetteurs impliqués notamment dans le remodelage des fins prolongements astrocytaires au voisinage de la synapse (Molotkov et al., 2013; Tanaka et al., 2013) et dans la transmission et la plasticité synaptique via l'activation de récepteurs pré- et post-synaptiques (Haydon, 2006; Volterra and Meldolesi, 2005). Cependant, le rôle de la signalisation calcique astrocytaire dans les régulations synaptiques et vasculaires est encore l'objet de débats, certaines études contestant la portée physiologique du phénomène. Au vu des études les plus récentes, notamment dans le bulbe olfactif (Otsu et al., 2014), les signaux calciques astrocytaires pourraient être très localisés, au niveau des PAMPs notamment, et être ainsi non détectables par les techniques classiques d'exploration (Aguilhon et al., 2010; Fiacco et al., 2007; Petravicz et al., 2008).

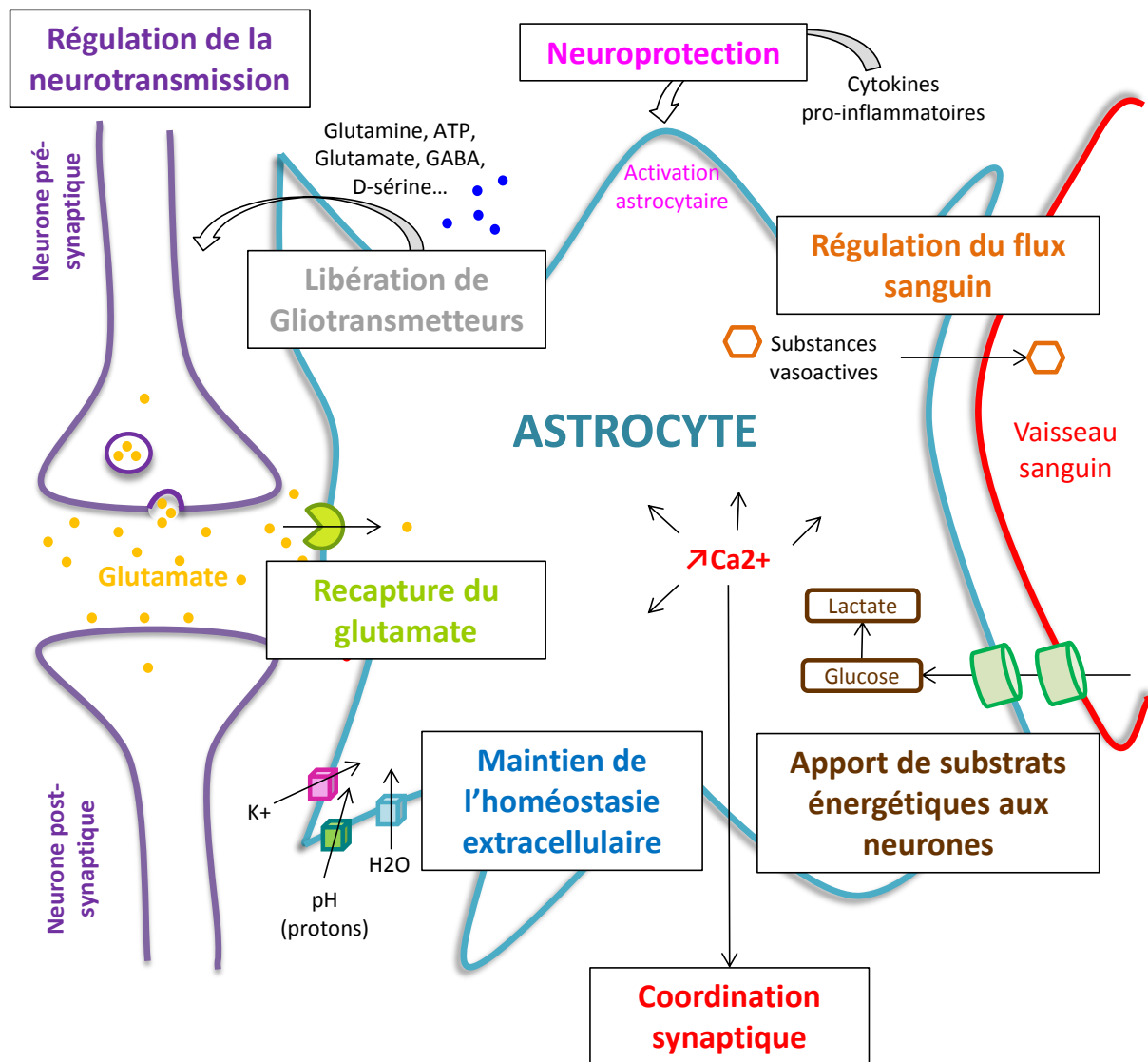







Figure 19: Présentation des principales fonctions astrocytaires au niveau de la synapse glutamatergique

-  Transporteurs d'ions potassiques
-  Transporteurs protons
-  AQP-4
-  Transporteurs du glucose (GLUTs)
-  Transporteurs du glutamate (GLT-1; GLAST)

2. Les fonctions astrocytaires (figure 19)

Rôle de support métabolique (Figure 20)

Bien que représentant seulement 2% du poids du corps humain, le cerveau consomme environ 20% du glucose et de l'oxygène, qu'il puise dans la circulation sanguine. Le glucose traverse la barrière hémato-encéphalique par le biais de transporteurs du glucose (GLUT) exprimés par les cellules endothéliales des vaisseaux sanguins. Une fois dans l'espace extra-cellulaire, il est recapté par les neurones et les astrocytes, exprimant tous deux des transporteurs GLUT. Les neurones consomment 90% de l'énergie mais la recapture du glucose est équivalente dans les deux types cellulaires. Et pour cause, les astrocytes servent de « support métabolique » aux neurones *via* le cycle du lactate. En effet, lors de période d'hypoglycémie ou pendant une période activité neuronale élevée, les besoins énergétiques sont augmentés et l'utilisation du glycogène astrocytaire permet de soutenir l'activité neuronale. Après recapture du glucose par les astrocytes, celui-ci est transformé en pyruvate puis en lactate, grâce à la glycolyse. Le lactate produit est libéré par l'astrocyte et pourra être capté par le neurone pour servir de substrat métabolique, *via* sa conversion en pyruvate et son entrée dans le cycle de Krebs (Pellerin et al., 1998, 2007) afin de fournir de l'ATP, principal substrat énergétique impliqué dans les fonctions neuronales (Tsacopoulos and Magistretti, 1996). Des études de modélisation suggèrent que pendant les périodes d'activité neuronale élevée, le lactate libéré par les astrocytes devient le substrat énergétique préférentiel des neurones (Occhipinti et al., 2008).

Rôle de régulateur du flux sanguin (Figure 21)

Lors d'une activité neuronale élevée, les astrocytes détectent les changements d'activité neuronale *via* les neurotransmetteurs libérés et sont capables d'augmenter le débit sanguin cérébral localement, permettant ainsi aux neurones l'apport de nutriments et d'oxygène adaptés à leurs besoins (Halassa et al., 2007b; Koehler et al., 2009; Zonta et al., 2002). Ce phénomène de couplage entre l'activité neuronale et le flux sanguin est qualifié d'hyperhémie fonctionnelle et est contrôlé par les pieds astrocytaires (ou périvasculaires) entourant les vaisseaux sanguins. C'est au niveau de ces pieds astrocytaires que les astrocytes libèrent des substances vaso-actives, permettant de contrôler localement le débit sanguin cérébral (Howarth, 2014; Magistretti, 2006; Petzold and Murthy, 2011; Zonta et al., 2002).

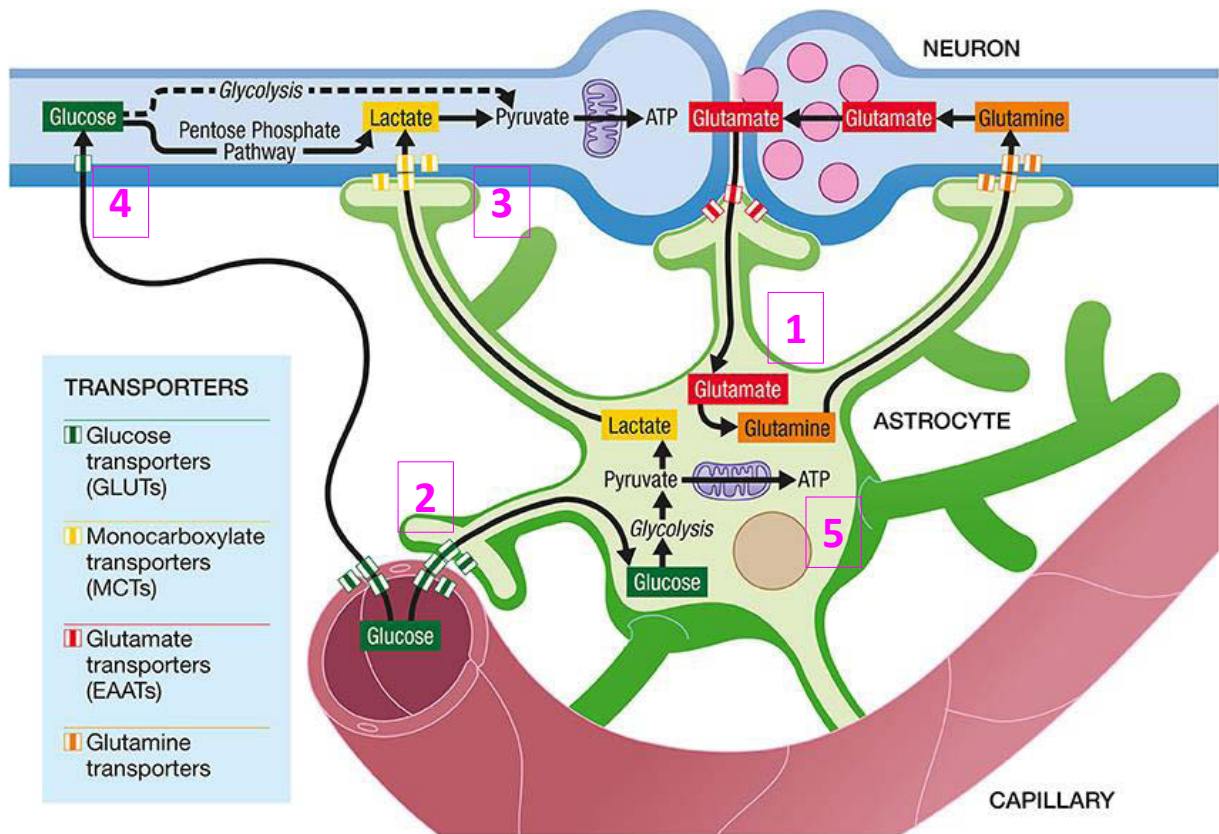


Figure 20: Schéma simplifié du couplage neuro-métabolique entre neurones et astrocytes (D'après Demetrius et al., 2015)

Parallèlement au recyclage du glutamate en glutamine par les astrocytes (1), l'absorption de glutamate dans les astrocytes déclenche une augmentation de la glycolyse passant par une augmentation de la consommation de glucose de la circulation sanguine par les astrocytes *via* des transporteurs spécifiques du glucose (GLUTs) sur les cellules endothéliales et les astrocytes (2). Le lactate produit par les astrocytes sera libéré dans l'espace extracellulaire. Pour faire face à leurs besoins énergétiques accrus suite à l'activation synaptique, les neurones captent le lactate et l'oxydent pour produire de l'ATP (3). Les neurones absorbent également le glucose de la circulation via un transporteur de glucose spécifique (4). Une partie du glucose, capté par les astrocytes, peut être métabolisée par la glycolyse puis oxydée dans les mitochondries pour fournir l'ATP (5).

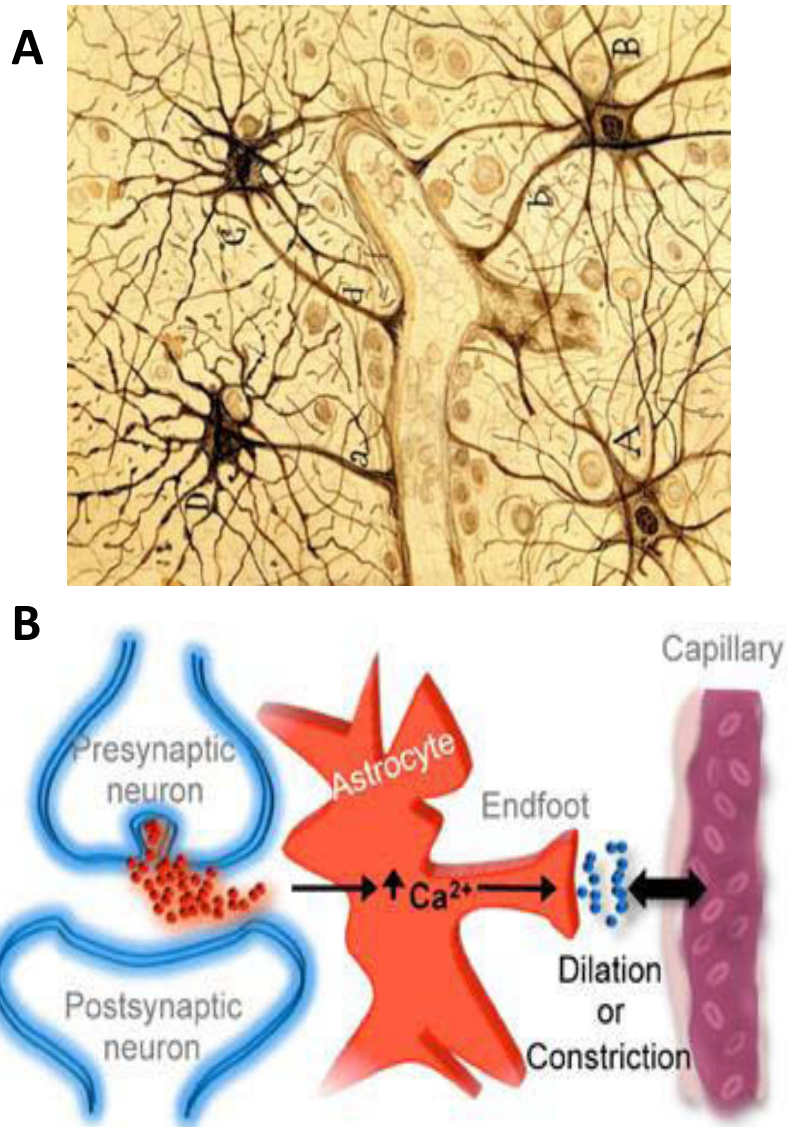


Figure 21: Régulation du flux sanguin par les astrocytes (D'après Navarrete et Araque, 2014)

A: Dessin de Ramon y Cajal représentant des astrocytes du cortex cérébral humain entourant un vaisseau sanguin.

B: Schéma illustrant le contrôle, par les astrocytes, du couplage entre l'activité neuronale et le flux sanguin. Lors d'une activité neuronale élevée, les astrocytes sont capables d'augmenter le débit sanguin cérébral localement, via la libération de substances vaso-actives, permettant ainsi aux neurones l'apport de nutriments et d'oxygène adaptés à leurs besoins.

Ce rôle a été récemment illustré dans le cortex visuel par des IRM montrant des changements dans la circulation sanguine en réponse à des stimuli visuels (Schummers et al., 2008; Wolf and Kirchhoff, 2008), ainsi que dans le bulbe olfactif en réponse à des stimuli odorants (Chaigneau et al., 2007; Otsu et al., 2014; Petzold and Murthy, 2011).

Rôle dans le maintien de l'homéostasie extracellulaire

Les astrocytes sont impliqués dans le maintien de l'homéostasie ionique, primordiale pour l'excitabilité neuronale, grâce à l'expression de différents transporteurs et canaux ioniques (Simard and Nedergaard, 2004). Le potassium est particulièrement concerné car sa concentration extracellulaire peut doubler localement lors d'une transmission synaptique, et devenir toxique en induisant une hyperexcitabilité neuronale (Kreisman and Smith, 1993). Riches en transporteurs d'ions potassiques, les astrocytes sont capables de réguler cette concentration extracellulaire et jouent ainsi un rôle important dans l'homéostasie potassique (Walz, 2000).

Lors d'une transmission de potentiels d'action, la recapture du potassium extracellulaire s'accompagne également d'un gonflement astrocytaire lié à une augmentation du volume d'eau. La capture de l'eau par les astrocytes au niveau de la synapse permettrait de diminuer le volume de la fente synaptique, concentrant ainsi les neurotransmetteurs libérés (Amiry-Moghaddam and Ottersen, 2003; Simard and Nedergaard, 2004). Le transport de l'eau dans les astrocytes met notamment en jeu l'aquaporine 4 (AQP4), canal membranaire permettant le passage de l'eau entre les vaisseaux sanguins et le cerveau (Amiry-Moghaddam and Ottersen, 2003). De plus, les astrocytes libèrent et expriment des récepteurs aux neuropeptides (comme l'atriopéptine, l'angiotensinogène ou la vasopressine), impliqués dans le contrôle de l'homéostasie de l'eau (Benfenati and Ferroni, 2010; Simard and Nedergaard, 2004).

Les astrocytes jouent également un rôle clé dans la régulation du pH au niveau cérébral (Obara et al., 2008) grâce à des transporteurs de protons, tels que des transporteurs du bicarbonate, des transporteurs de l'acide monocarboxylique ou encore les ATPases.

Rôle de capture du glutamate

Les astrocytes participent au maintien de l'homéostasie cérébrale également en agissant sur la diffusion et la capture des neurotransmetteurs comme le glutamate (Sheldon & Robinson, 2007). L'expression de transporteurs de différents neurotransmetteurs permet aux astrocytes de détecter et de réguler de façon rapide et efficace leur concentration dans la fente synaptique, ce qui permet de maintenir l'homéostasie des neurotransmetteurs et de réguler la transmission synaptique. Ce phénomène a conduit à élaborer le concept de synapse "tripartite", dans lequel l'information circule

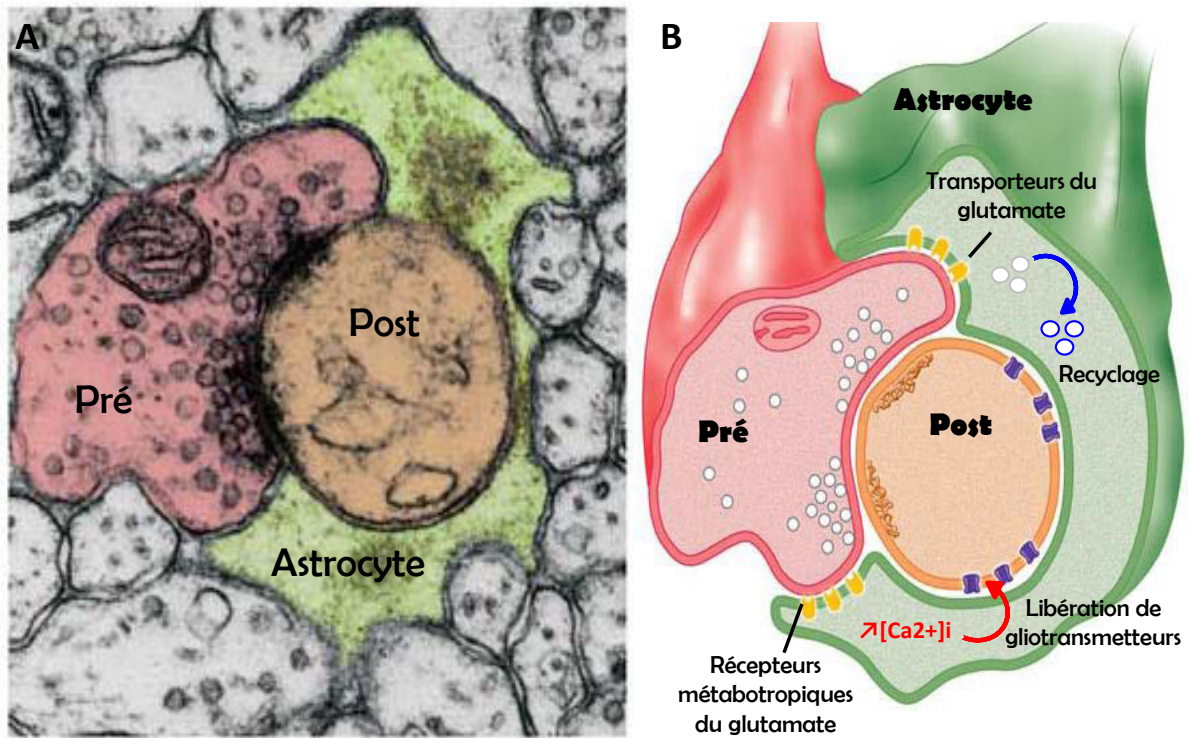


Figure 22: La synapse tripartite (Adapté de Perea G. et al., 2005)

A: Microscopie électronique montrant la nature des structures de la synapse tripartite avec les prolongements astrocytaires (vert) associés avec les terminaisons pré- (coloré en rose) et post- (coloré en orange) synaptiques. B: Représentation schématique de la synapse tripartite vue par microscopie électronique (A). Pré= Terminaison pré-synaptique; Post= terminaison post-synaptique; $\uparrow[Ca^{2+}]_i$ = augmentation de calcium intracellulaire

Les astrocytes expriment la plupart des récepteurs neuronaux. Lorsque des neurotransmetteurs sont libérés au niveau des terminaisons présynaptiques d'un neurone, les récepteurs métabotropiques astrocytaires sont activés, ce qui conduit à une augmentation des ions calcium dans l'astrocyte et à la libération de gliotransmetteurs (ATP, D-sérine, glutamate ...) qui agissent sur les neurones au niveau pré et post-synaptique afin de moduler l'activité neuronale. L'expression de transporteurs astrocytaires aux différents neurotransmetteurs permet également aux astrocytes de réguler de façon rapide et efficace leur concentration dans la fente synaptique ainsi que leur recyclage (notamment pour le glutamate), afin de maintenir l'homéostasie des neurotransmetteurs et de réguler la transmission synaptique.

non seulement entre les éléments pré- et postsynaptiques neuronaux mais, en plus, entre les neurones et les compartiments astrocytaires adjacents (Figure 22). Les astrocytes sont en particulier, les partenaires essentiels de la plupart des synapses glutamatergiques, comme celles que l'on retrouve au sein des glomérules du bulbe olfactif. Grâce à 2 transporteurs spécifiques, GLAST (ou EAAT1) et GLT-1 (ou EAAT2), les astrocytes participent à environ 90% de l'élimination du glutamate extracellulaire et à son recyclage vers le neurone, permettant ainsi de réguler la concentration en glutamate dans la fente synaptique, selon l'intensité du signal glutamatergique (Danbolt, 2001). Le glutamate capté par l'astrocyte est converti en glutamine, acide aminé non toxique qui sera à son tour redistribué aux neurones (Danbolt, 2001). Cette capture est essentielle car son insuffisance induit un risque d'excitotoxicité, causée par un excès de glutamate (Porter and McCarthy, 1997) et principale cause de mort neuronale. Le glutamate peut diffuser dans l'espace pérисynaptique et interagir avec ses récepteurs pré-synaptiques métabotropiques, induisant ainsi une inhibition rétroactive de sa propre libération (Oliet, 2001). Il peut également diffuser aux synapses voisines et, par l'intermédiaire des mécanismes pré-synaptiques similaires, influencer l'activité d'autres synapses, contribuant ainsi à la diaphonie inter-synaptique (Oliet et al., 2004). Ces processus sont autant de niveaux de régulation associés au transport astrocytaire du glutamate.

Libération de gliotransmetteurs

Les astrocytes sont capables de synthétiser et de libérer des gliotransmetteurs (Glutamate, D-sérine, ATP, GABA...). La libération des gliotransmetteurs est induite par des augmentations du calcium cytosolique astrocytaire, suite à l'activation des récepteurs métabotropiques et ionotropiques astrocytaires par les neurotransmetteurs libérés dans la fente synaptique (Glutamate, GABA etc...) (Araque et al., 1999; Kang et al., 1998). Les gliotransmetteurs agissent directement sur leurs récepteurs neuronaux situés au niveau pré- et post-synaptique. Leurs actions participent à la régulation de la neurotransmission et modulent l'excitabilité neuronale ou la libération de neurotransmetteurs. En contact avec plusieurs milliers de synapses, un astrocyte participe également, *via* la libération de gliotransmetteurs, à la synchronisation des réseaux neuronaux en modulant l'activité de plusieurs neurones et la plasticité de leurs connexions (Perea and Araque, 2010).

De nombreux travaux ont montré l'influence des gliotransmetteurs sur la transmission synaptique. Par exemple, dans l'hypothalamus, l'ATP libéré par les astrocytes, est capable de moduler la transmission synaptique, en augmentant la libération neuronale de glutamate (Gordon et al., 2005). Dans d'autres cas, la libération d'ATP par les astrocytes suite à un stimuli GABAergique peut inhiber la libération de glutamate des neurones (Pascual, 2005; Serrano, 2006). Dans certaines régions du

cerveau, la D-sérine, libérée par les astrocytes (Mothet et al., 2005; Panatier et al., 2006), et considérée comme un intermédiaire important dans la neurotransmission du glutamate, se lie au site de la glycine et sert de co-agoniste endogène des récepteurs NMDA. Dans l'hypothalamus (Panatier et al., 2006), l'hippocampe (Shleper, 2005; Yang et al., 2003) et la rétine (Stevens et al., 2003), l'activité du récepteur NMDA nécessite la D-sérine astrocytaire plutôt que la glycine, généralement considérée comme le co-agoniste de ces récepteurs.

Rôle de neuro-protection

Les astrocytes sont des acteurs clé de la neuro-protection au niveau du SNC. Lors d'une altération de l'homéostasie cérébrale (déséquilibres des concentrations extra-cellulaires en ions et métabolites, infections virale ou bactérienne, trauma, stress...), l'activation de la microglie conduit à la libération de cytokines pro-inflammatoires (IL1 β , IL6 et TNF α ...), qui vont à leur tour activer les astrocytes via des récepteurs spécifiques (Ghirnikar et al., 1998) et la signalisation calcique astrocytaire. En réponse, les astrocytes ont la capacité de moduler et d'adapter leurs fonctions pour restaurer l'homéostasie du milieu extracellulaire et maintenir une signalisation synaptique optimale. Cette activation astrocytaire peut être transitoire et réversible, ou plus sévère et conduire au phénotype gliotique (réaction astrocytaire ou astrogliose), essentiellement ciblé sur la réparation des dommages neuronaux, et qui se traduit notamment par une hypertrophie des ramifications astrocytaires et par une forte augmentation de l'expression de GFAP (Sofroniew, 2009).

3. La plasticité morphologique des astrocytes

La plasticité neuronale recouvre plusieurs notions, incluant les changements qui conduisent à une augmentation ou une diminution de l'efficacité synaptique (plasticité synaptique), et les processus de renouvellement synaptique et neuronal (synaptogenèse et neurogenèse). La plasticité astrocytaire inclut des processus qui régulent l'expression des récepteurs et transporteurs, la plasticité morphologique, la signalisation calcique, la libération de gliotransmetteurs, ainsi que l'ensemble des processus qui contrôlent l'environnement ionique et métabolique impliqué dans le maintien de l'homéostasie. Seule la plasticité morphologique des astrocytes sera abordée ici, puisque c'est ce phénomène sur lequel se sont concentrés mes travaux de thèse.

La plasticité morphologique astrocytaire définit la capacité des astrocytes à déployer ou rétracter leurs prolongements principaux et périphériques, notamment au niveau des synapses qu'ils entourent, modulant ainsi le degré de recouvrement astrocytaire dans ces structures. De nombreuses études montrent que la plasticité morphologique des astrocytes est liée à l'activité

neuronale et souvent couplée à des changements morphologiques au niveau des neurones voisins et à la formation de nouvelles synapses en réponse à des stimuli physiologiques (Theodosis et al., 2004, 2008a). Cette plasticité neuro-astrocytaire met en évidence la remarquable capacité du cerveau à restructurer les réseaux synaptiques en fonction de son activité. La dynamique du recouvrement astrocytaire a été de nombreuses fois observée *in vivo* chez le rat, notamment au niveau du cortex somato-sensoriel (Genoud et al., 2006), du cortex visuel (Jones et al., 1996), des noyaux supra-optiques (Theodosis, 2002) ou supra-chiasmatisques (Becquet et al., 2008; Lavielle and Servièrre, 1995). J'ai choisi de présenter plus précisément deux exemples, largement étudiés et décrits dans la littérature, illustrant le phénomène de plasticité morphologique astrocytaire impliqué dans des processus d'activation et de régulation neuronale en réponse à des stimuli sensoriels ou hormonaux.

a. [Exemples de plasticité morphologique astrocytaire au cours de réponse neuronale à des stimuli physiologiques](#)

La plasticité astrogliale au sein du noyau supra-optique

Les noyaux supra-optiques (NSO) de l'hypothalamus sont composés de neurones magnocellulaires (NMCs) synthétisant et sécrétant l'ocytocine (OT) ou la vasopressine (VP). En tant que neuro-hormone l'OT est impliquée dans des fonctions de reproduction comme la parturition et la lactation, alors que la VP participe à l'homéostasie hydrominérale et vasculaire (Landgraf and Neumann, 2004). L'étude de ce système neuroendocrinien *via* la microscopie électronique a fourni une des premières démonstrations que les astrocytes sont des cellules dynamiques, modifiant leur morphologie en relation avec l'activité des neurones adjacents (Theodosis and Poulain, 1993; Theodosis et al., 1981; Tweedle and Hatton, 1977) et constituant ainsi un niveau de régulation spécifique.

Les neurones OT et VP répondent aux stimulations afférentes par une augmentation de leurs activités électrophysiologiques et sécrétoires (Poulain and Wakerley, 1982) par des changements morphologiques incluant une hypertrophie progressive de leur soma (Theodosis, 2002), et de l'arborisation dendritique (Stern and Armstrong, 1998), ainsi que par un allongement et une augmentation des ramifications au niveau de leurs axones (Hatton et al., 1984; Monlezun et al., 2005). En conditions basales, les neurones OT non-stimulés sont séparés physiquement les uns des autres par de fins prolongements astrocytaires. En revanche au cours de l'accouchement, pendant

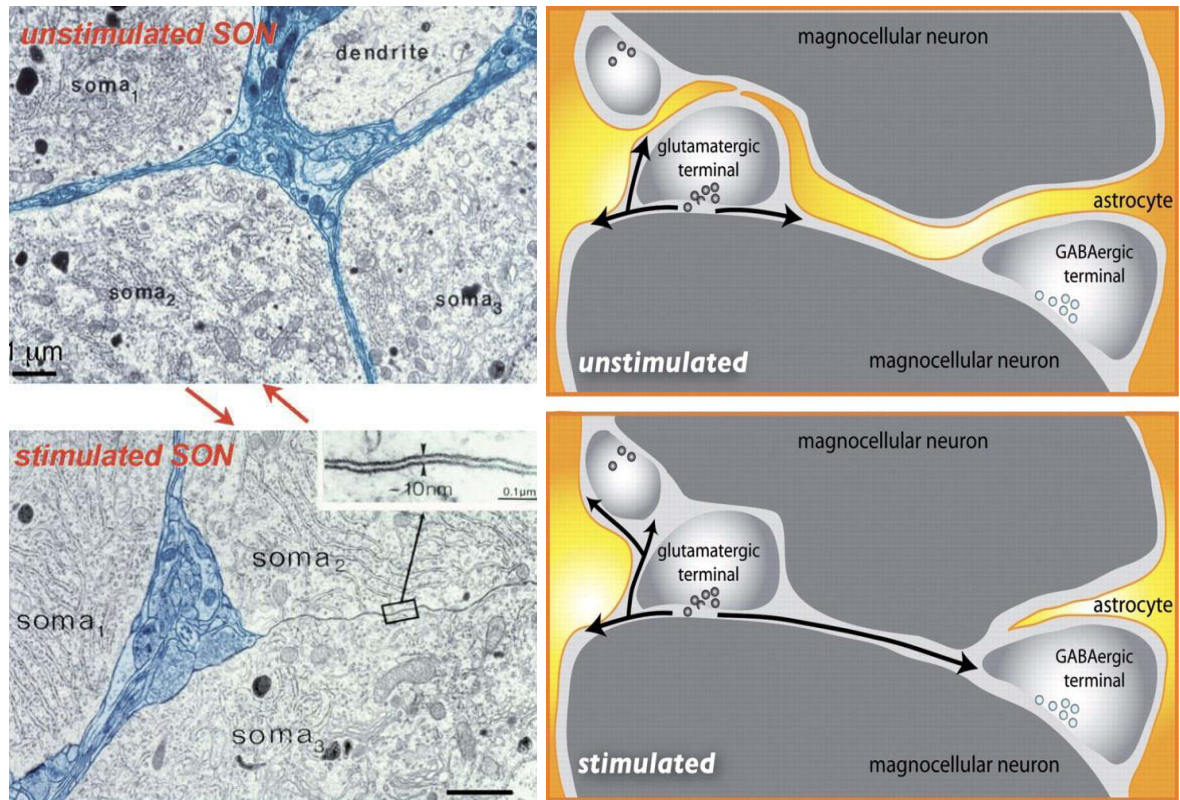


Figure 23: Présentation de la plasticité morphologique astrocytaire dans le noyau supra-optique (D'après Théodosis et al., 2008).

Les photographies prises en microscopie électronique (photos à gauche) montrent les différences de recouvrement astrocytaire au niveau des neurones à ocytocine (OT) du noyau supra-optique, entre la condition basale (non-stimulé, photo du haut) ou au cours de la lactation et parturition (stimulé) (photo du bas). Lors de la parturition et de la lactation, les activités électriques et sécrétoires des neurones à OT sont augmentées et la couverture astrocytaire est diminuée au niveau des somas neuronaux et des dendrites. Lorsque l'activité est de nouveau réduite (après le sevrage des jeunes, par exemple), le noyau supra-optique revient à son état d'origine, dont l'augmentation de la couverture astrocytaire au niveau des neurones, sépare les éléments neuronaux entre eux.

Le schéma de droite illustre les prolongements astrocytaires périphériques (jaune) entre les neurones du noyau supra-optique et autour des terminaisons axonales, en conditions de neurosécrétion non stimulées (par exemple chez les rats vierges ou post-sevrés) (Schéma du haut) et stimulées (chez les rates en lactation ou lors de la déshydratation) (Schéma du bas). Sous stimulation, la rétraction des prolongements astrocytaires favorise la diffusion (flèches noires) du glutamate libéré au niveau synaptique dans l'espace extracellulaire, qui peut alors agir sur les mêmes synapses et / ou sur des synapses adjacentes (interactions homo et hétérosynaptiques) modulant ainsi la neurotransmission des neurones à OT (magnocellular neuron). D'après Theodosis et al. 2008.

l'allaitement, face à la déshydratation chronique ou en réponse à des concentrations ambiantes élevées d'OT, une réduction significative de la couverture astrocytaire au niveau des somas des neurones OT et des synapses contactant ces neurones est observée (Oliet, 2001; Theodosis, 2002). La couverture astrogliale des somas ocytocinergiques passe alors de 90% à 70% (Theodosis et al., 1986) (Figure 23). Cette plasticité morphologique, qui a été observée chez plusieurs espèces de mammifères (le rat (Theodosis, 2002), la souris (Theodosis et al., 2004), et plusieurs rongeurs du désert (Ouali et Theodosis, observations non publiées mais signalées dans la revue (Theodosis et al., 2008a)), se déroule dans l'ensemble de l'hypothalamus, au niveau de chaque noyau contenant des neurones OT. En revanche, en réponse à la stimulation de la sécrétion de la VP, la couverture astrocytaire des neurones VP n'est pas modifiée et reste à 90%. La plasticité de l'interaction morphologique entre astrocytes et neurones semble donc spécifique d'un type neuronal précis (Chapman et al., 1986; Theodosis et al., 1986).

Les analyses *In vivo* suggèrent que cette plasticité morphologique neurone-glie est rapide, puisque les changements ont été détectés dans les quelques heures suivant l'apparition de la parturition (Montagnese et al., 1988) ou de la stimulation osmotique (Tweedle and Hatton, 1977). De plus, les analyses *in vitro* à partir de coupes d'hypothalamus adulte incluant le NSO (Langle et al., 2003; Theodosis et al., 2006), montrent que ces modifications morphologiques astrocytaires se produisent très rapidement, moins de 1 h après stimulation de la neurosécrétion. Lorsque la sécrétion d'OT revient à des niveaux de référence (par exemple, après le sevrage du jeune ou de la réduction de l'OT ambiante), les prolongements astrocytaires réapparaissent entre les regroupements neuronaux, et les neurones magnocellulaires reviennent en quelques heures à leur morphologie « non stimulée ». (Langle et al., 2003; Monlezun et al., 2005). Cette plasticité est donc rapide et réversible, comme celle des neurones.

La diminution de la couverture astrocytaires autour des neurones à OT et de leurs synapses glutamatergiques, chez des rates allaitantes, a de nombreuses répercussions au sein de l'organisation et du fonctionnement de ces synapses. Le retrait des prolongements astrocytaires de la fente synaptique entraîne une augmentation des contacts synaptiques, une diminution de la clairance du glutamate (Figure 23), et donc une facilitation de la diffusion des substances neuroactives. Cet effet a pour conséquence, une augmentation de la rétroaction négative du glutamate sur sa propre libération au niveau pré-synaptique ainsi que l'activation non spécifique de synapses voisines (Boudaba et al., 2003; Oliet, 2001; Oliet et al., 2004). Cette plasticité morphologique a également des conséquences sur l'accessibilité aux synapses des gliotransmetteurs libérés par les astrocytes, notamment la D-sérine (Langle et al., 2003; Panatier et al., 2006) (Figure 24). Dans des conditions basales, où le recouvrement astrocytaire est étendu, la D-sérine sature presque complètement

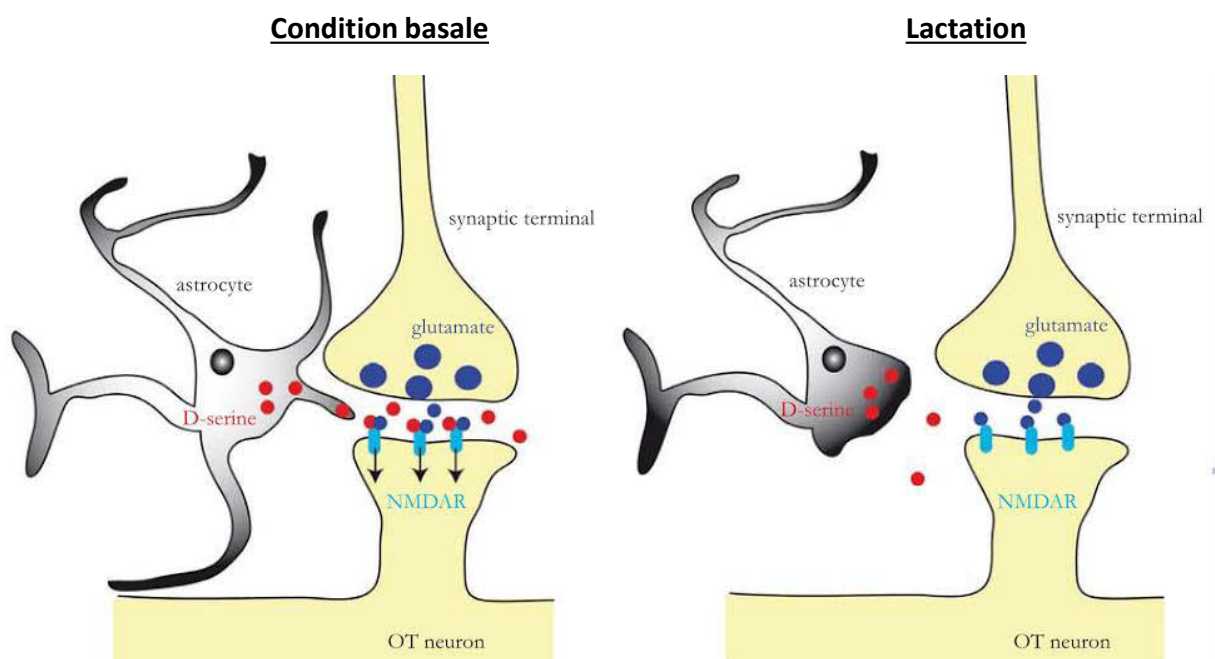


Figure 24: Présentation schématique des modifications de la gliotransmission dans le noyau supra-optique lors de la lactation (D'après le livre *Neurophysiology of Neuroendocrine Neurons* de William E.)

Dans des conditions non stimulées (schéma de gauche), les astrocytes fournissent de la D-sérine aux synapses glutamatergiques des neurones à ocytocine (OT neuron), permettant l'activation du récepteur NMDA. Chez les rates en lactation (schéma de droite), le retrait des prolongements astrocytaires provoque une déficience en apport de D-sérine, ce qui nuit à l'activation du récepteur NMDA

les sites de glycine sur les récepteurs NMDA (Panatier et al., 2006). En revanche, chez les rates allaitantes la réduction du recouvrement astrocytaire entraîne une diminution des taux de D-sérine autour des synapses. L'occupation des sites de glycine est alors faible et l'activité des récepteurs NMDA est fortement réduite modifiant ainsi les processus de plasticité synaptique (Langle et al., 2003; Panatier et al., 2006). Globalement, ce nouvel état lié à la rétraction astrocytaire a pour conséquence d'augmenter la puissance du ratio signal bruit reliant le processus de la tétée à la libération d'ocytocine. On voit bien dans cet exemple que la plasticité morphologique astrocytaire a des conséquences fonctionnelles importantes sur la neurotransmission. C'est ce que l'on appelle une métaplasticité.

La plasticité astrogliale au sein du noyau supra-chiasmatique des rongeurs

Le noyau suprachiasmatique de l'hypothalamus (NSC) est le siège de l'horloge circadienne, petite structure contenant différentes populations neuronales assurant la coordination des rythmes physiologiques avec le cycle jour-nuit. Cette structure comprend un réseau astrocytaire important qui se déploie et se rétracte au cours du cycle jour-nuit. Cette plasticité morphologique rythmique a d'abord été montrée chez le hamster, modèle pour l'étude des rythmes circadiens, par analyse immunohistochimique de la GFAP, dans les travaux de Lavialle et al. (Lavialle and Servière, 1995; Lavialle et al., 2001). Sous l'effet de la lumière, et *via* des afférences glutamatergiques en provenance de la rétine (afférences indépendantes du nerf optique), le réseau astrocytaire se déploie durant le jour, et se rétracte pendant la nuit (Lavialle and Servière, 1995; Lavialle et al., 2001) (Figure 25). D'autres études ont confirmé cette plasticité morphologique rythmique, chez le hamster, la souris, le rat, avec cependant des divergences sur la temporalité et le calage sur le rythme jour-nuit (Becquet et al., 2008). Des études de microscopie électronique ont précisé, chez le rat, que les variations du déploiement astrocytaire avaient une rythmicité différente, voir inverse, selon le type neuronal concerné. Ces résultats montrent une couverture astrocytaire plus élevée (+29%) pendant la nuit pour les neurones exprimant le peptide intestinal vasoactif (VIP) et pendant le jour pour les neurones exprimant l'arginine vasopressine (VAP) (Becquet et al., 2008). La rétraction des prolongements astrocytaires autour des neurones VIP durant le jour est associée à une augmentation du nombre des synapses au niveau de ces neurones (Girardet et al., 2010) (Figure 26). Les astrocytes du NSC peuvent ainsi différenciellement réguler la signalisation et la synchronisation de ces deux sous-populations au cours du cycle circadien (Lavialle et al., 2001).

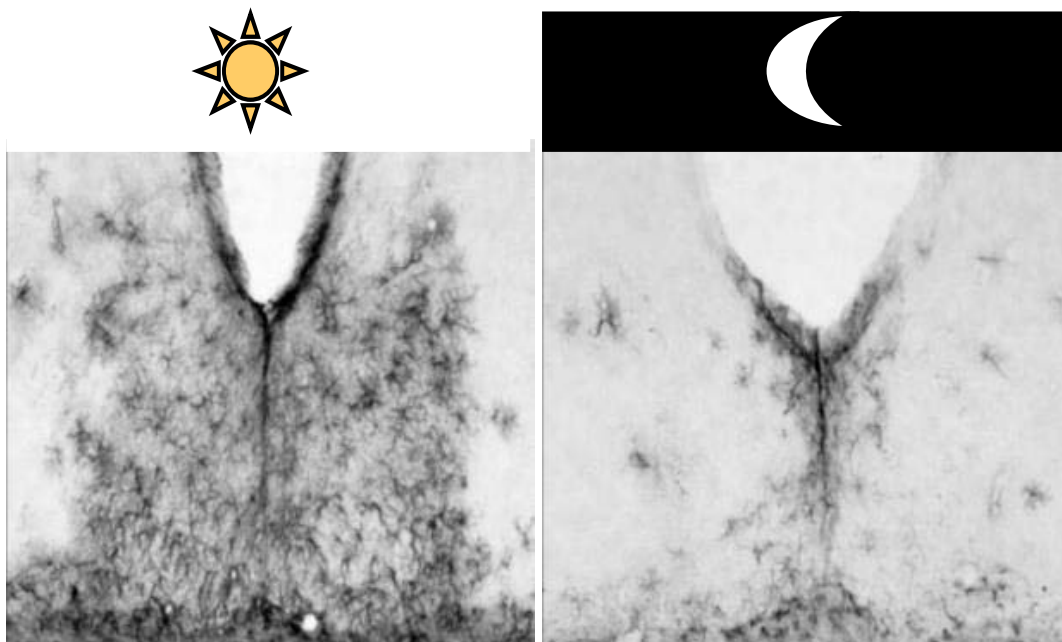


Figure 25: Modification du déploiement astrocytaire dans le noyau supra-chiasmatique au cours du cycle jour/nuit (D'après Lavalie et al., 2001)

Présentation du réseau astrocytaire du noyau supra-chiasmatique de hamster, au cours du cycle jour / nuit par un marquage immunohistochimique de la GFAP. Sous l'effet de la lumière, *via* des afférences glutamatergiques en provenance de la rétine, le réseau astrocytaire se déploie durant le jour (photo de gauche) , et se rétracte pendant la nuit (photo de droite). *D'après Lavalie et al., 1995, 2001.*

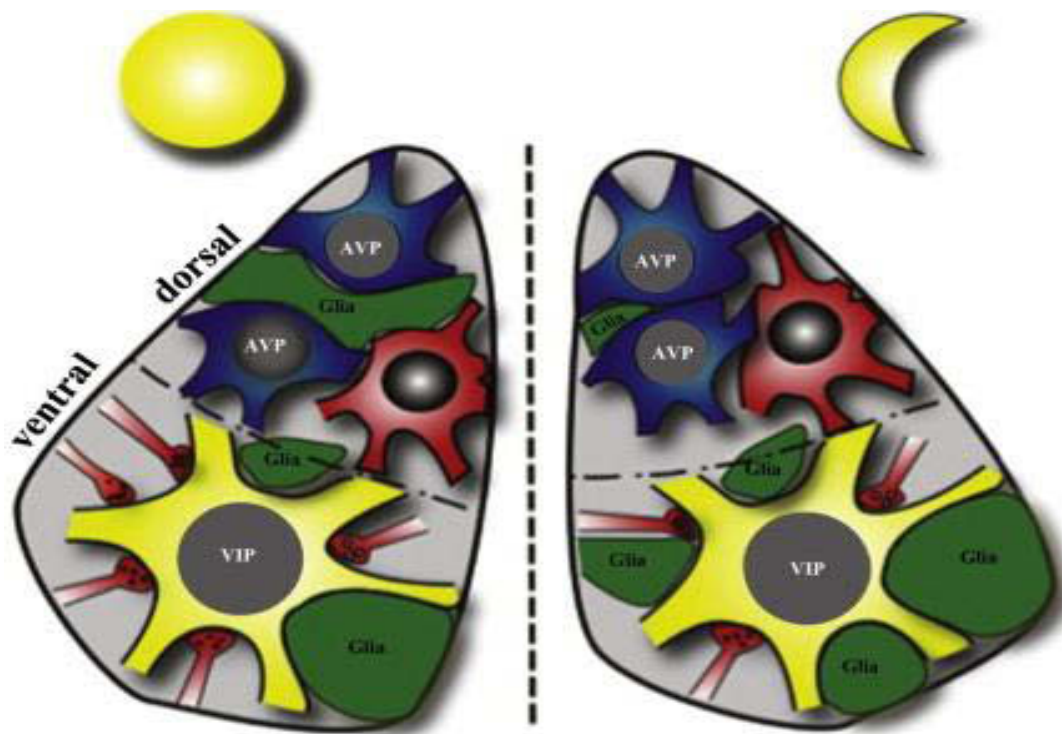


Figure 26: Présentation schématique des modifications différentielles de recouvrement astrocytaire dans le noyau supra-chiasmatique au cours du cycle jour/nuit, en fonction du type neuronal (D'après Bosler et al., 2015)

La couverture astrocytaire est plus élevée (+29%) pendant la nuit pour les neurones exprimant le peptide intestinal vasoactif (PIV) (schéma de droite) et pendant le jour pour les neurones exprimant l'arginine vasopressine (PAV) (schéma de gauche). La rétraction des prolongements astrocytaires autour des neurones PIV durant le jour est associée à une augmentation du nombre des synapses au niveau de ces neurones. D'après Bosler et al., 2015.

De nombreux résultats expérimentaux suggèrent que ces mouvements astrocytaires peuvent réguler la neurotransmission glutamatergique issue des afférences rétiniennes, et être ainsi le moteur du recalage des oscillations des neurones du NSC sur la durée du jour (Girardet et al., 2010; Lavalie and Servièrre, 1995; Lavalie et al., 2001; Moriya et al., 2000; van den Pol et al., 1992; Tamada et al., 1998). Des études *In vitro* sur tranche de NSC de rat, ont également montré que l'application de fluorocitrate inhibant le métabolisme astrocytaire affecte le rythme électrique circadien et l'activité neuronale provoquant ainsi une rythmicité ultradienne (Prosser et al., 1994). Les conséquences de ces perturbations neuronales sont visibles *in vivo* par l'injection dans le NSC de fluorocitrate chez le rat, qui entraîne une perturbation du rythme de l'activité locomotrice.

Ainsi, en plus de jouer un rôle dans la coordination des neurones, la plasticité morphologique astrocytaire est un acteur essentiel dans la réception de l'information lumineuse, dans les NSC (Oliet and Bonfardin, 2010; Theodosis et al., 2008a).

Une plasticité morphologique astrocytaire a également été observée dans les structures hypothalamiques impliquées dans la reproduction. Pendant la période pré-ovulatoire chez le rat, des déploiements astrocytaires ont lieu au niveau des somas et des dendrites des neurones libérant l'hormone des gonadotrophines hypophysaires (GnRH) (Gerhold and Wise, 2006). Des modifications morphologiques astrocytaires se produisent également dans les circuits neuronaux régulant l'activité des neurones à GnRH, en particulier dans la zone péri-suprachiasmatique, impliquée dans la coordination entre les rythmes circadiens et le pic de l'hormone lutéinisante (LH) (Garcia-Segura, 2008). Les exemples de plasticité morphologique astrocytaire dans les noyaux hypothalamiques suggèrent que ces cellules contribuent à faire le lien entre des stimuli environnementaux ou hormonaux et les réponses adaptatives générées par les neurones (Oliet and Bonfardin, 2010; Theodosis et al., 2008a).

Sur la base de ces observations, nous avons fait l'hypothèse qu'une telle plasticité morphologique astrocytaire pourrait exister au sein des glomérules du BO en réponse à des changements physiologique tels que l'état nutritionnel, et pourrait contribuer à moduler la transmission du signal olfactif. Les astrocytes glomérulaires pourraient ainsi relayer les informations métaboliques et hormonales associées à l'état de faim ou de satiété et permettre l'adaptation de la sensibilité olfactive, telle qu'elle a été observée chez le rongeur et chez l'homme (Aimé et al., 2007; Prud'homme et al., 2009).

b. Les mécanismes sous-tendant la plasticité morphologique des astrocytes

La plasticité morphologique des astrocytes regroupe des processus relativement divers, qu'il n'est pas toujours possible en l'état actuel des connaissances de catégoriser précisément en termes de mécanismes moléculaires et de fonctionnalité. La notion de plasticité morphologique astrocytaire s'applique ainsi aux processus de :

- déploiement-rétraction des prolongements principaux (riches en GFAP) et périphériques (PAPs, riches en ezrine), décrit précédemment dans les noyaux hypothalamiques, qui repose sur des ré-arrangements du cytosquelette, et module le niveau d'interactions entre les compartiments astrocytaires et neuronaux.
- motilité des PAPs autour des boutons dendritiques, observée en imagerie sur tissu vivant, qui repose aussi sur des ré-arrangements dynamiques du cytosquelette et joue un rôle dans la genèse et la consolidation des synapses (Bernardinelli et al., 2014).
- gonflement-rétraction du volume cytoplasmique. En réponse aux activités de contrôle du milieu extra-cellulaire, il met en jeu les mécanismes de transport des molécules, ions et eau, et permet aux astrocytes de tamponner la concentration de métabolites en excès (Heller and Rusakov, 2015)
- hypertrophie associée à l'astrogliose. En réponse à des dommages physiques ou chimiques, elle repose sur des changements phénotypiques complexes et permet à l'astrocyte de jouer un rôle de barrière protectrice (Götz et al., 2015; Kettenmann et al., 2011).

Dans bien des observations physiologiques, il est possible que plusieurs niveaux de plasticité morphologique co-existent et impliquent plusieurs types de mécanismes cellulaires.

Les réarrangements du cytosquelette

Les changements morphologiques des astrocytes sont la conséquence de réarrangements des protéines du cytosquelette, incluant différents niveaux de polymérisation et d'association entre protéines, survenant généralement sans modification de leur niveau d'expression (Safavi-Abbasi et al., 2001). Ces réarrangements, leurs effecteurs et les cascades de phosphorylations impliquées, ont surtout été étudiés *in vitro*. En culture, les astrocytes peuvent passer d'une morphologie pavimenteuse (aussi appelée plate, cuboïdale, épithéliale...), associée à des filaments de GFAP peu polymérisés, des fibres d'actine dites fibres de stress et/ou un anneau d'actine corticale, à une

morphologie étoilée dans laquelle l'actine est dépolymérisée, et au contraire la GFAP est polymérisée en faisceaux denses. C'est surtout dans la morphologie étoilée que l'on peut observer la motilité particulière des PAPs considérés comme les compartiments astrocytaires en contact avec les synapses (Derouiche and Frotscher, 2001). Même si ces morphologies sont assez peu superposables à celles observées *in vivo*, elles présentent une plasticité similaire qui repose sur des mécanismes permettant l'émission, la rétraction, ou la motilité des prolongements. Elle met en jeu des voies de signalisation impliquant les petites protéines GTPases (Rho, Ras etc...) et induisant des remaniements des complexes d'adhérence focale (complexes protéiques (taline, vinculine, paxiline...) assurant l'interface entre cytosquelette et matrice extra-cellulaire) et des changements de conformation des protéines du cytosquelette (myosine, actine, GFAP...) (Bretscher et al., 2002; Derouiche et al., 2002). Les mouvements des PAPs reposent ainsi sur la formation de structures de type lamellipodes et filopodes qui impliquent l'eitrine, protéine de liaison de la membrane à l'actine, très présente au niveau de ces structures (Bretscher et al., 2002; Derouiche and Frotscher, 2001; Derouiche et al., 2002).

La motilité des PAPs a été mise en évidence *in situ*, par imagerie dans des tranches d'hippocampe en survie et plus récemment *in vivo* dans le cortex somato-sensoriel de souris adultes. Cette étude *in vivo* montre une interaction bidirectionnelle entre les synapses et les astrocytes, dans laquelle l'activité synaptique et la potentialisation synaptique régulent la plasticité structurale des PAPs, qui à son tour détermine le sort de la synapse (stabilisation ou élimination) (Bernardinelli et al., 2014). Ce mécanisme peut représenter une contribution importante des astrocytes aux processus d'apprentissage et de mémoire. Cette motilité des PAPs est rapide, dépendante de l'actine et peut en quelques minutes faire varier le recouvrement astrocytaire des synapses et des boutons dendritiques (Bernardinelli et al., 2014; Haber, 2006).

L'implication des canaux AQP4 et Kir4.1 dans le gonflement astrocytaire

Les astrocytes sont capables de réguler les volumes de communication extracellulaire par gonflement ou rétrécissement (Reichenbach et al., 2010). Le contrôle du volume du milieu extracellulaire par les astrocytes repose principalement sur un transporteur d'eau, l'aquaporine 4 (AQP-4), et la sous-unité majeure des canaux K^+ astrocytaires, Kir4.1, qui sont exprimées dans les membranes des PAPs. Ces canaux permettent de médier le gonflement astrocytaire notamment lors d'augmentation des concentrations de K^+ extracellulaire (Anderova et al., 2014; Heller and Rusakov, 2015; Mongin and Kimelberg, 2005; Reichenbach et al., 2010).

La signalisation calcique astrocytaire

La signalisation calcique, souvent induite par l'activité synaptique, peut également jouer un rôle central dans les mécanismes qui contrôlent le remodelage des PAPs au voisinage de la synapse. La signalisation des mGluRs (récepteurs métabotropiques du glutamate) par des protéines Gq déclenche la libération de calcium provenant de réserves intracellulaires telles que le réticulum endoplasmique (Volterra et al., 2014). Cette cascade peut à son tour influencer la dynamique de l'actine et donc la croissance des PAPs (Tanaka et al., 2013). La signalisation calcique astrocytaire pourrait ainsi : 1) optimiser le positionnement des transporteurs du glutamate gliaux pour permettre une plus grande efficacité de recapture du glutamate (Danbolt, 2001) ; 2) modifier le positionnement des sites de libération des gliotransmetteurs à proximité des récepteurs neuronaux extra-synaptiques (Volterra and Meldolesi, 2005) ; 3) permettre la libération des substrats énergétiques tels que le lactate à proximité des transporteurs neuronaux ; 4) de réguler le contenu ionique de l'espace extra-synaptique.

Les facteurs résultant de l'activité synaptique

De nombreux facteurs sont capables d'induire une plasticité morphologique astrocytaire (Heller and Rusakov, 2015), notamment les facteurs libérés lors de l'activité synaptique (glutamate, ATP) et certaines hormones (leptine, (Argente-Arizón et al., 2016)). Dans les NSC, les travaux de M. Laviaille et al. (Laviaille et al., 2001) basés sur des modifications expérimentales de l'activité rétinienne, suggèrent que le glutamate, libéré par les afférences en provenance de la rétine, est un régulateur majeur de la plasticité astrogliale. Sur des modèles *in vitro*, plusieurs études ont confirmé que le glutamate est capable d'induire l'émission ou la rétraction rapide des PAPs ainsi qu'un gonflement astrocytaire (Cornell-Bell et al., 1990; Hansson et al., 1994; Laviaille et al., 2001; Noble et al., 1992; O'Connor and Kimelberg, 1993).

Le déclenchement neuronal de potentiels d'action conduit également à la libération d'ions potassium dans l'espace extracellulaire du tissu neural et l'extrusion de CO₂ des neurones actifs provoquant des changements de pH localisés dans l'espace extracellulaire. Les variations de concentrations de K⁺ et de pH extracellulaires sont également capables de stimuler la formation de nouveaux prolongements astrocytaires (Reichelt et al., 1989).

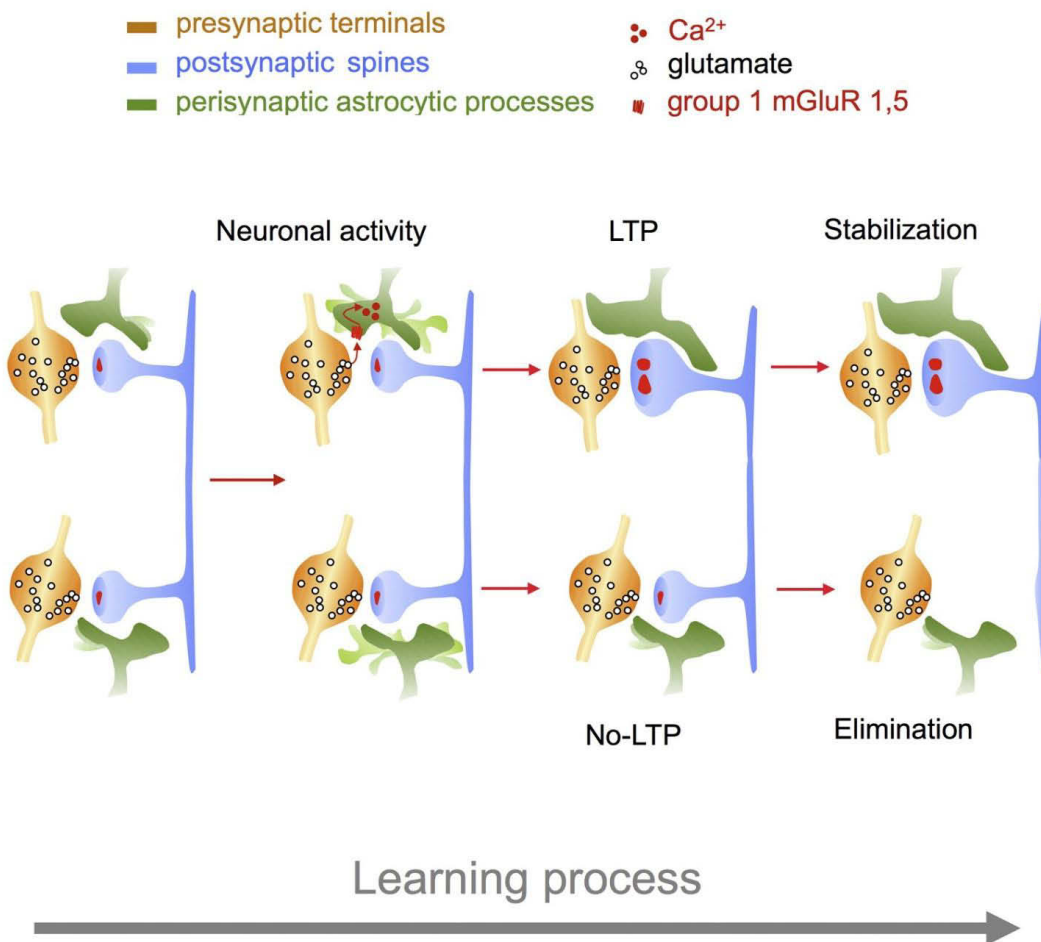


Figure 27: Présentation schématique des interactions bidirectionnelles entre synapses et astrocytes dans les processus de consolidation et de renforcement des synapses (D'après Bernardilleni et al., 2014)

Présentation schématique des interactions bidirectionnelles entre les synapses et les astrocytes, dans laquelle l'activité synaptique et la potentialisation synaptique régulent la plasticité structurelle des prolongements péri-synaptiques astrocytaires (Les PAPs), qui à leur tour déterminent le sort de la synapse (stabilisation ou élimination). Ce mécanisme peut représenter une contribution importante des astrocytes aux processus d'apprentissage et de mémoire. *D'après Bernardilleni et al., 2014.*

c. Les conséquences de la plasticité morphologique des astrocytes sur la neurotransmission

Régulation de la neurotransmission

Le déploiement-rétraction des prolongements astrocytaires détermine le niveau de la présence astrocytaire autour des synapses. Dans les différents modèles cités précédemment, il a été montré que ce niveau de présence contrôle la transmission glutamatergique via la régulation astrocytaire de la concentration extra-cellulaire en glutamate et la libération des gliotransmetteurs. Entre autre, la rétraction des prolongements astrocytaires de la fente synaptique a pour conséquence : 1) la diffusion du glutamate dans l'espace péri-synaptique provoquant l'activation non spécifique de synapses voisines (Oliet et al., 2004) ; 2) la diminution de la clairance du glutamate entraînant des modifications de transmission glutamatergique, notamment observées dans le NSO (Oliet et al., 2004) ou dans le cervelet (Iino, 2001); 3) mais également la diminution de libération de certains gliotransmetteurs, comme la D-sérine dans le NSO, modifiant ainsi les processus de plasticité synaptiques (Oliet et al., 2004; Panatier et al., 2006). A l'inverse le déploiement astrocytaire, observé le jour dans le NSC, favorise la synchronisation des oscillations neuronales (Becquet et al., 2008; Lavialle et al., 2001).

Consolidation et renforcement des synapses

La plasticité structurale des PAPs a également un effet direct sur l'environnement synaptique en déterminant le niveau de contact synaptique. La simple présence astrocytaire le long de la surface neuronale peut empêcher la formation de nouvelles synapses jouant ainsi un rôle de barrière physique. En effet, dans le NSO, la rétraction des prolongements astrocytaires au cours de la lactation favorise la formation de synapses multiples (Oliet et al., 2004; Theodosios et al., 2008a). Les astrocytes participent également activement à la synaptogenèse et au remodelage synaptique dans le développement du cerveau adulte (Heller and Rusakov, 2015). La motilité des PAPs intervient dans la consolidation et le renforcement des synapses (Figure 27) (Bernardinelli et al., 2014). Au contraire, l'inhibition de la motilité des PAPs (par exemple en inhibant le système de contact neurones-astrocytes passant par l'EphrinA3 et le récepteur Eph A4) limite la stabilisation des épines dendritiques et réduit la formation des synapses. Les interactions transitoires entre le ligand éphrine-A3 et le récepteur EphA4 sont des éléments essentiels de la stabilisation dépendant des astrocytes et de la structure des synapses excitateurs (Murai et al., 2003; Nestor et al., 2007; Nishida and Okabe, 2007). En outre, l'interaction de EphA4 / éphrine-A3 détermine l'expression péri-synaptique des

transporteurs du glutamate des astrocytes et, par conséquent, modulent la potentialisation synaptique à long terme (Filosa et al., 2009).

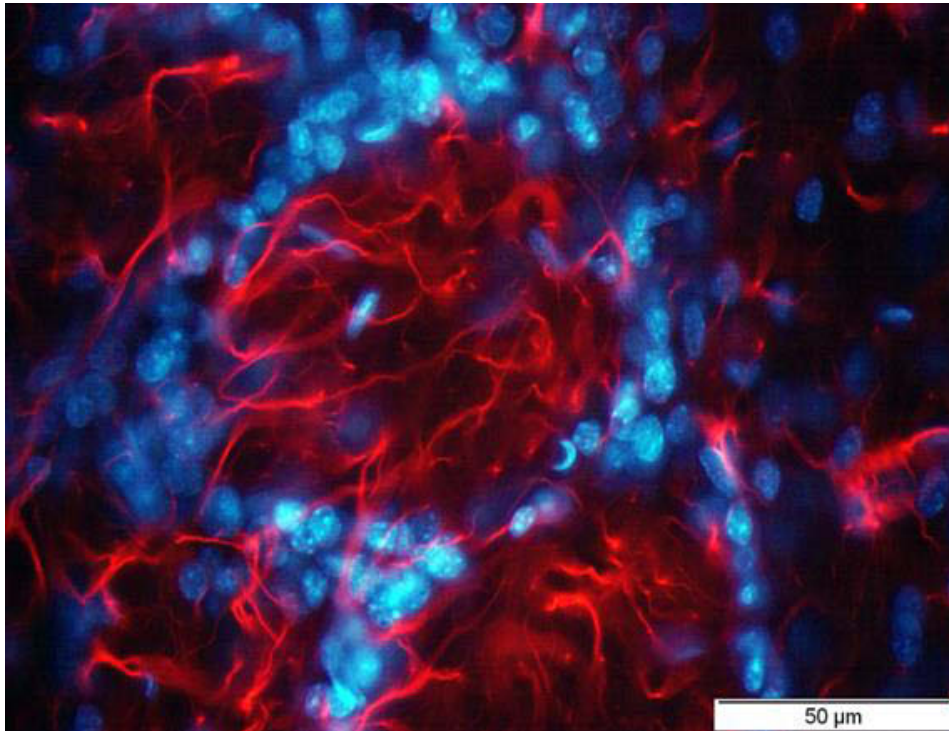
4. Les astrocytes glomérulaires, au cœur des relations entre olfaction et prise alimentaire ?

a. Les astrocytes glomérulaires

Distribution et morphologie des astrocytes du BO

Les astrocytes bulbaires ont une distribution et une morphologie hétérogène entre les différentes régions du BO ; on observe une plus haute densité de GFAP dans la couche glomérulaire et dans la plexiforme externe (Bailey and Shipley, 1993). Au sein de la couche glomérulaire, les corps cellulaires des astrocytes forment une enveloppe presque complète autour d'un glomérule et projettent des prolongements dans le neuropile central (Bailey and Shipley, 1993; Chao et al., 1997a; Valverde and Lopez-Mascaraque, 1991) (Figure 28). Les prolongements d'astrocytes entourant un neuropile glomérulaire peuvent également se prolonger dans la « paroi » glomérulaire adjacente, mais ces prolongements n'ont pas été observés entrant dans un glomérule adjacent (Chao et al., 1997a). L'étude du ratio astrocytes sur cellules juxta-glomérulaires a montré que les astrocytes constituent environ 7% de toutes les cellules de la couche glomérulaire.

Les astrocytes et cellules juxta-glomérulaires encapsulent au sein des glomérules un réseau serré de terminaisons axonales de neurones olfactifs en provenance de la MO, de dendrites apicales des cellules mitrales et des cellules à panache, de dendrites d'interneurones périglomérulaires locaux, d'arrivées neuronales centrifuges et de vaisseaux capillaires (Pinching and Powell, 1971). Les études en microscopie électronique montrent que les glomérules sont subdivisés en deux compartiments distincts suivant la nature des régulations qui s'exercent sur les cellules mitrales, et que ces deux compartiments sont très hétérogènes en terme de recouvrements astrocytaires (Chao et al., 1997a; Kasowski et al., 1999a). On y trouve un compartiment dit « sensoriel » qui regroupe les synapses sensorielles axo-dendritiques entre les neurones olfactifs et les cellules mitrales; et un compartiment « non-sensoriel » regroupant les synapses dendro-dendritiques entre les neurones peri-glomérulaires



GFAP/hoechst

Figure 28: Les astrocytes glomérulaires du bulbe olfactif

Visualisation par immunohistochimie des prolongements astrocytaires glomérulaires, marqués par la GFAP (marquage rouge) et des noyaux des cellules juxta-glomérulaires délimitant les glomérules, marqués par du Hoechst (marquage bleu).

Au sein de la couche glomérulaire, les corps cellulaires des astrocytes forment une enveloppe presque complète autour d'un glomérule et projettent des prolongements dans le neuropile central. Les astrocytes constituent environ 7% des cellules juxta-glomérulaires.

et les mitrales, ainsi que les synapses axo-dendritiques entre les projections des fibres centrifuges (sérotoninergiques et cholinergiques) en provenance des régions plus centrales et les neurones péri-glomérulaires et mitrales. D'après les travaux de Chao et al., 1997 et de Kasowski et al., 1999, l'ensemble des synapses axo-dendritiques et dendro-dendritiques du compartiment « non-sensoriel » sont fréquemment entourées de PAPs astrocytaires, en revanche les synapses axo-dendritiques du compartiment « sensoriel » sont dépourvues de prolongements gliaux (Chao et al., 1997b; Kasowski et al., 1999b). Au sein du compartiment « sensoriel » les PAPs astrocytaires semblent être présents uniquement au niveau des différents faisceaux d'axones des neurones olfactifs afin de les séparer les uns des autres en formant de minces cloisons (Chao et al., 1997a). Les PAPs astrocytaires glomérulaires semblent également faire barrière entre les compartiments sensoriels et non-sensoriels. Ces auteurs observent par ailleurs une grande variation de la présence astrocytaire d'un glomérule à l'autre.

Présentation des différentes études menées sur les astrocytes glomérulaires au niveau de la synapse sensorielle glutamatergique

Le traitement de l'information olfactive dans les glomérules olfactifs entraîne une forte demande d'énergie. Non seulement les glomérules ont l'une des consommations de glucose les plus élevées dans le cerveau (Johnson and Leon, 2000), mais ils possèdent aussi la plus forte densité de réseau vasculaire (Chaigneau et al., 2007). Le système métabolique et hémodynamique glomérulaire est régulé par les astrocytes (Bailey and Shipley, 1993; Petzold et al., 2008) qui contiennent des réserves de glycogène. L'hyperémie fonctionnelle induite par une odeur dans les capillaires glomérulaires est fortement corrélée avec la libération de glutamate au niveau pré-synaptique. La stimulation par une odeur induit un courant calcique transitoire au niveau des pieds astrocytaires et est associée à une dilatation des artérioles en amont. L'élévation du calcium dans les astrocytes et l'hyperémie fonctionnelle dépendent des récepteurs métabotropiques du glutamate de type 5. Les transporteurs astrocytaires du glutamate contribuent également à l'hyperémie fonctionnelle grâce à des mécanismes indépendants de la hausse de calcium (Petzold et al., 2008).

Par ailleurs, la capture du glutamate *via* les transporteurs astrocytaires GLAST, fortement exprimés dans le BO, notamment au niveau glomérulaire (Utsumi et al., 2001), semble essentielle à l'activation neuronale, et aux oscillations générées dans le BO (Martin et al., 2012). La délétion de GLAST chez des souris transgéniques entraîne une altération de la réponse olfactive fonctionnelle en altérant les oscillations neuronales du BO (Martin et al., 2012).

Le potassium extracellulaire augmente dans les glomérules après les stimulations afférentes (Friedrich and Korsching, 1998; Jahr and Nicoll, 1981; Khayari et al., 1988). Les prolongements astrocytaires servent alors de barrière et permettent entre autre la recapture du potassium extracellulaire (Amédée et al., 1997; Kofuji and Newman, 2004) empêchant ainsi la propagation de l'activité neuronale ainsi que la stimulation neuronale de neurones adjacents (Goriely et al., 2002). Une étude *In vivo* a montré que le potassium extracellulaire accumulé lors d'une activité neuronale module localement la communication entre les astrocytes glomérulaires (Roux et al., 2011), affectant ainsi la coordination synaptique orchestrée par ces cellules gliales *via* la propagation de vagues calciques. Cette communication semble dépendante des jonctions gap formées par les connexines 30 entre les astrocytes particulièrement exprimées au cœur des glomérules (Roux et al., 2011).

L'ensemble de ces données indiquent que des interactions dynamiques neurones-astrocytes se produisent au sein des glomérules, premier relai du traitement de l'information olfactive.

Les études des astrocytes du BO ont permis d'avancer sur leur morphologie (Bailey and Shipley, 1993; Chiu and Greer, 1996), leur conductance membranaire (De Saint Jan, 2005), leur contribution à des réponses hémodynamiques (Chaigneau et al., 2007; Gurden et al., 2006) et leur rôle central dans la neurogénèse bulbaire dans laquelle ils contrôlent la genèse, la migration et la survie des différents sous-types d'interneurones (Gengatharan et al., 2016). Le rôle des astrocytes glomérulaires et leur implication réelle dans la fonction olfactive, restent à ce jour mal connus et assez peu étudiés.

b. Les astrocytes dans le contrôle de la balance énergétique

Les astrocytes ont une situation privilégiée dans le cerveau où ils font partie de la barrière hémato-encéphalique (BHE) et sont en contact intime avec les éléments vasculaires et synaptiques (Abbott et al., 2010; Wang et al., 2014), ce qui fait d'eux des éléments essentiels dans la communication entre le SNC et la périphérie (Tsacopoulos and Magistretti, 1996). Les signaux métaboliques et hormonaux entraînent des modifications fonctionnelles et morphologiques de l'hypothalamus visant à maintenir l'homéostasie métabolique. Des données récentes plaident en faveur d'un rôle essentiel des astrocytes dans l'orchestration de la réponse hypothalamique aux signaux métaboliques, *via* leur participation à la régulation synaptique et à la détection des nutriments. Les astrocytes expriment des récepteurs aux différents peptides impliqués dans la régulation de l'homéostasie énergétique, telles que la leptine, l'insuline, les glucocorticoïdes, et la ghréline (Baquedano et al., 2013 ; Chowen et al., 2016). Comme dans l'hypothalamus, les astrocytes pourraient participer, dans le BO, à la détection des variations de l'état métabolique et à l'adaptation de la sensibilité olfactive. Afin de comprendre comment les astrocytes pourraient être impliqués dans la régulation de la réponse

olfactive par l'état métabolique, les interactions connues entre les astrocytes et les différents signaux métaboliques sont détaillées ci-dessous.

Les astrocytes, « biosenseurs » du glucose

Les pieds astrocytaires qui entourent les vaisseaux sanguins expriment les transporteurs du glucose (les GLUTs) (Kacem et al., 1998; Morgello et al., 1995; Vannucci et al., 1997). Ces transporteurs assurent le transport actif du glucose de la circulation sanguine vers l'ensemble des cellules du cerveau (Kacem et al., 1998; Morgello et al., 1995), et permettent également aux astrocytes d'être des « senseurs » de l'état métabolique systémique en détectant les taux circulants de glucose, en particulier *via* GLUT2 qu'ils expriment (Marty, 2005a; Stolarczyk et al., 2010b). Cette détection est importante pour le maintien de l'homéostasie du glucose, à la fois centrale et systémique, et participe aux régulations hypothalamiques entraînant des modifications de la prise alimentaire (Guzmán and Blázquez, 2001). L'étude d'animaux dépourvus du récepteur à l'insuline uniquement dans les astrocytes, soit dans le cerveau, soit spécifiquement dans l'hypothalamus médiobasal, indiquent un rôle clé de l'insuline dans la détection systémique du glucose par les astrocytes hypothalamiques (García-Cáceres et al., 2011). L'expression des récepteurs de l'insuline dans les astrocytes hypothalamiques est nécessaire à la réponse adaptative de l'organisme aux changements de la glycémie (García-Cáceres et al., 2014).

Les astrocytes, « biosenseurs » des peptides impliqués dans la régulation de l'homéostasie énergétique

En plus de participer à la détection du glucose et des lipides (Leloup et al., 2016), les astrocytes expriment les récepteurs aux hormones impliquées dans le contrôle de la prise alimentaire (leptine, ghréline, insuline) et y répondent (Hsuchou et al., 2008; Kim et al., 2014). De nombreux facteurs hormonaux et métaboliques sont capables de modifier la morphologie et les fonctions astrocytaires, (García-Cáceres et al., 2011, 2016). La leptine et son action hypothalamique *via* les astrocytes a fait l'objet de nombreuses études ces dernières années et est actuellement l'exemple le mieux décrit pour comprendre l'importance du rôle des astrocytes dans l'adaptation neuronale aux variations physiologiques ou pathologiques de l'état métabolique.

L'importance physiologique des effets de la leptine sur les astrocytes a été récemment démontrée par l'étude de modèles génétiquement modifiés. L'ablation spécifique du récepteur de la leptine dans les cellules GFAP positives, modifie l'organisation synaptique du système mélanocortine (neurones à POMC) chez la souris ainsi que la réponse de satiété à la leptine (Kim et al., 2014). La perte de ce récepteur au niveau astrocytaire diminue le nombre et la longueur des prolongements

astrocytaires dans le noyau arqué. Ceci est associé à une diminution de la couverture astrocytaire des neurones à POMC entraînant une augmentation du nombre de connexions synaptiques sur ces neurones. Ainsi, le nombre de synapses sur le soma des neurones à POMC hypothalamiques est inversement lié à sa couverture gliale (Horvath, 2006; Horvath et al., 2010; Kim et al., 2014) (phénomène semblable à ce que l'on retrouve dans le noyau supra-optique). Kim et ses collègues ont également montré dans ce modèle des modifications de l'activité électrique des neurones à POMC et à AgRP. Ces modifications anatomiques et fonctionnelles sont associées à la diminution de la réponse anorexigénique à la leptine et à l'augmentation de la réponse orexigène induite par l'administration de ghréline ou la mise à jeun des animaux (Kim et al., 2014). De plus, ces souris délétées pour le récepteurs astrocytaires à la leptine, semblent être résistantes à l'aggravation de l'obésité induite par une alimentation riche en matières grasses, puisqu'elles présentent une résistance à l'hyperleptinémie ainsi qu'une diminution d'expression de leptine au niveau de la graisse sous-cutanée, comparativement à des souris témoins également rendues obèses par l'alimentation (Jayaram et al., 2013). Non seulement la perte du récepteur de la leptine dans les astrocytes diminue la réponse physiologique à la leptine, mais elle augmente également la réponse à la ghréline et au jeûne (Kim et al., 2014). Ainsi la leptine entraîne des changements morphologiques astrocytaires au sein de l'hypothalamus (García-Cáceres et al., 2014; Kim et al., 2014) très probablement impliqués et/ou responsables de modifications de connectivités synaptiques des neurones hypothalamiques POMC et NPY, impactant leurs fonctionnalités (Cowley et al., 2001; Horvath, 2006, 2006; Kim et al., 2014).

D'autre part, la leptine modifie la capacité des astrocytes hypothalamiques à transporter à la fois le glutamate et le glucose. Ainsi, les changements morphologiques astrocytaires s'accompagnent également de modifications fonctionnelles pouvant avoir des répercussions sur la neurotransmission. Les effets de la leptine sur la capture du glucose par les astrocytes (Fuente-Martín et al., 2012) peuvent également modifier sa redistribution aux neurones. Chez le rat, une exposition prolongée à la leptine (*in vivo* par administration chronique intra-cérébroventriculaire ou *in vitro* sur culture primaire d'astrocytes hypothalamiques) stimule la production de différentes cytokines astrogliales (García-Cáceres et al., 2011) pouvant avoir des effets bénéfiques ou préjudiciables selon le type, l'intensité et la durée du stimulus (Fuente-Martín et al., 2012).

La leptine n'est pas le seul peptide auquel les astrocytes sont sensibles. Les astrocytes expriment également le récepteurs GHSR1a (Baquedano et al., 2013; Dixit et al., 2006) ce qui indique qu'ils peuvent participer à la réponse physiologique de la ghréline au niveau cérébral. Les effets de la

ghréline sur les astrocytes ont été récemment explorés dans l'hypothalamus de rats par l'étude de Fuente-Martín et al., 2016. Cette étude met en évidence un effet stimulant de la ghréline sur les fonctions de régulation des astrocytes hypothalamiques (*in vivo* et *in vitro*). La ghréline augmente le transport du glutamate ainsi que l'expression des transporteurs du glutamate GLT-1 et GLAST, et diminue l'absorption du glucose ainsi que l'expression du transporteur du glucose GLUT2.

Les astrocytes expriment également les récepteurs au NPY (NPYR), notamment NPY1R (Barnea et al., 1998; St-Pierre et al., 2000) et semblent sensibles à l'action de ce neuropeptide (Höslí et al., 1993 ; Barnea et al., 1998 ; Ramamoorthy and Whim, 2008). Ainsi, l'administration intracérébroventriculaire *in vivo* de NPY chez la souris, augmente significativement la prolifération des astrocytes dans la zone sous-ventriculaire cérébrale, principalement *via* le récepteur Y1R (Decressac et al., 2009). Par ailleurs, les astrocytes, comme les neurones, sont capables de synthétiser le NPY dans certaines conditions physiologiques et / ou pathologiques (Barnea et al., 1998) et de le sécréter de manière Ca²⁺-dépendante en réponse à l'activation des récepteurs métabotropiques au glutamate (Ramamoorthy and Whim, 2008). Cependant, l'action du NPY au niveau astrocytaire (morphologie, fonctionnalité...) dans le maintien de l'homéostasie énergétique reste peu connue et difficile à étudier. En effet, si le NPY est connu pour être un régulateur majeur de la prise alimentaire et de l'homéostasie énergétique (Lin et al., 2004), il joue également un rôle crucial dans de très nombreux processus neuronaux incluant neurogènèse (Geloso et al., 2015), stress (Hirsch and Zukowska, 2012), anxiété, mémorisation, cognition (Decressac and Barker, 2012). Il est donc difficile d'isoler spécifiquement l'un de ces effets au niveau des astrocytes. L'étude des effets du NPY au niveau astrocytaire a essentiellement concerné les processus de neurogènèse, notamment dans l'hippocampe (Rodrigo et al., 2010) ou dans le bulbe olfactif (Geloso et al., 2015).

c. Les astrocytes, senseurs métabolique du système olfactif ?

Près de 160 ans après la naissance du concept de neuroglie (R. Virchow, 1958), la notion de neurones assumant à eux seuls toutes les activités du SNC est depuis longtemps dépassée. La participation active des cellules gliales, et en particulier des astrocytes, dans le fonctionnement des réseaux neuronaux, est largement documentée. Et tout comme les neurones, les astrocytes sont doués de plasticité morphologique et fonctionnelle dans de nombreuses conditions physiologiques (et pathologiques). Cela signifie que les interactions dynamiques astrocytes-neurones font partie intégrante de la physiologie des processus cérébraux. Certains systèmes hypothalamiques, en particulier les noyaux supra-optique et supra-chiasmatique, illustrent remarquablement l'association étroite des activités neuronales et gliales et leur plasticité coordonnée dans différents états physiologiques. Ces observations offrent des preuves solides de la capacité des astrocytes à détecter

les variations environnementales, et à remodeler leurs prolongements en fonction de l'activité synaptique, afin de moduler et d'accompagner l'activité globale du réseau neuronal. Il est important de mieux comprendre ce remodelage astrocytaire, de vérifier s'il est présent dans d'autres structures que celle déjà explorées, et s'il est impliqué dans d'autres contextes physiologiques.

Les astrocytes, sont clairement impliqués dans le contrôle physiologique et physiopathologique du métabolisme énergétique, bien que les mécanismes restent à élucider. Ils participent, en coordination avec les neurones, et en étroite relation avec les système vasculaire, à la régulation de l'entrée des nutriments et des peptides impliqués dans la régulation de la prise alimentaire, dans le cerveau, en jouant le rôle de « senseurs métaboliques », en maintenant l'homéostasie énergétique et l'activité neuronale (Abbott et al., 2010; Tsacopoulos and Magistretti, 1996; Wang et al., 2015).

Au sein du BO, la transmission du signal olfactif au niveau des glomérules est une zone de fortes interactions neurones-astrocytes, rendant cette structure potentiellement sensible à de nombreuses régulations. Les astrocytes, très présents au niveau de cette zone synaptique, sont des cibles potentielles des signaux métaboliques susceptibles de modifier la morphologie de ces cellules gliales. Des modifications de la couverture astrocytaire dans les glomérules pourraient avoir des effets directs sur la transmission de l'information sensorielle olfactive au cerveau, et ainsi modifier la perception olfactive. Si une telle plasticité morphologique, induite par l'action de stimuli métaboliques, est présente au niveau des astrocytes glomérulaires, cela signifie que ces cellules peuvent avoir un rôle central dans l'adaptation de la réponse olfactive à l'état nutritionnel, étudiée depuis les années 1950 essentiellement au travers du prisme du fonctionnement neuronal.

MATERIEL ET METHODES

Matériels et Méthodes

I. Modèles

1. Modèles *in vivo*

a. Animaux

Les animaux utilisés dans cette étude sont des rats Wistar élevés au sein de l'animalerie de l'unité de Neurobiologie de l'Olfaction (NBO) de l'I.N.R.A. de Jouy-en-Josas. Les conditions d'élevage, de manipulation/expérimentation et d'euthanasie des animaux sont conformes aux directives de la CEE (86/609//CEE).

Les conditions de température ($22 \pm 1^\circ\text{C}$), d'humidité ($50 \pm 10\%$) et de lumières (alternance lumière/obscurité de 12 heures en cycle normal) sont maintenues constantes (en permanence). Le régime alimentaire est fourni sous forme solide (croquette) et les mangeoires sont remplies quotidiennement avec de la nourriture fraîche. Le régime est disponible *ad libitum*, excepté durant les mises à jeun ou pendant la réalisation de certains protocoles. L'eau est toujours fournie *ad libitum*.

Après sevrage les rats sont répartis 2 par 2 dans chaque cage. Pour toute cette étude, nous avons utilisé uniquement des rats mâles. Cela permet de réduire les variabilités interindividuelles notamment vis-à-vis des cycles hormonaux qui peuvent avoir une influence sur les résultats. Afin de limiter l'influence du stress sur les paramètres étudiés, les rats sont habitués aux différents traitements et/ou manipulations une semaine avant le début des expérimentations. Chaque expérience de notre étude a été reproduite sur plusieurs cohortes d'animaux.

b. Présentation des modèles animaux et des traitements associés

Les rats utilisés sont âgés de 5 à 7 semaines et pèsent en moyenne 200g. Le choix de cet âge a permis de concilier la réalisation des expérimentations *in vivo* (mises à jeun, injections de glucose ou de peptides orexigènes/anorexigènes) et *ex vivo* (tranches de BO en survie et traitements pharmacologiques), à un stade auquel les réseaux astrocytaires sont « matures » (au niveau cérébrale) ce qui était nécessaire pour notre étude (Thèse Barbara Grintal, 2009; Bushong et al., 2004; Catalani et al., 2002).

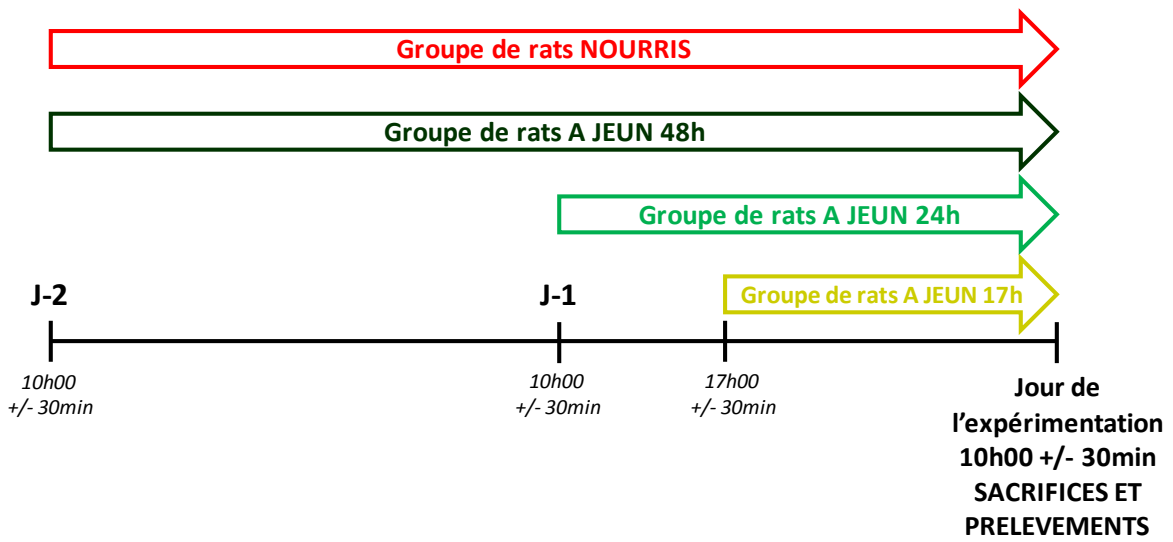


Figure 29: Protocole de mise à jeun des rats

Deux modèles *in vivo* ont été utilisés :

- Un modèle nous permettant de moduler l'état nutritionnel des rats grâce à différents temps de mise à jeun (nourris *ad libitum* versus à jeun pendant 17h, 24h ou 48h).
- Un modèle d'injection de glucose ou de peptides impliqués dans la régulation de la prise alimentaire chez des rats nourris *ad libitum* ou à jeun depuis 17h, afin de préciser l'implication des variations glycémiques ou des peptides orexigènes/anorexigènes dans la plasticité morphologique astrocytaire des glomérules bulbaires.

Protocole de mise à jeun des rats (Figure 29)

Les expérimentations sont réalisées sur plusieurs cohortes successives de 8 à 12 rats. Trois durées de jeûne, couramment utilisées dans la littérature, ont été étudiées : 17h, 24h et 48h. Les rats rassasiés ont accès *ad libitum* à la nourriture jusqu'à leur euthanasie. En revanche pour les rats en restriction alimentaire les croquettes sont retirées de la mangeoire 48h, 24h ou 17h avant le début des expérimentations et ce jusqu'aux sacrifices et prélèvements.

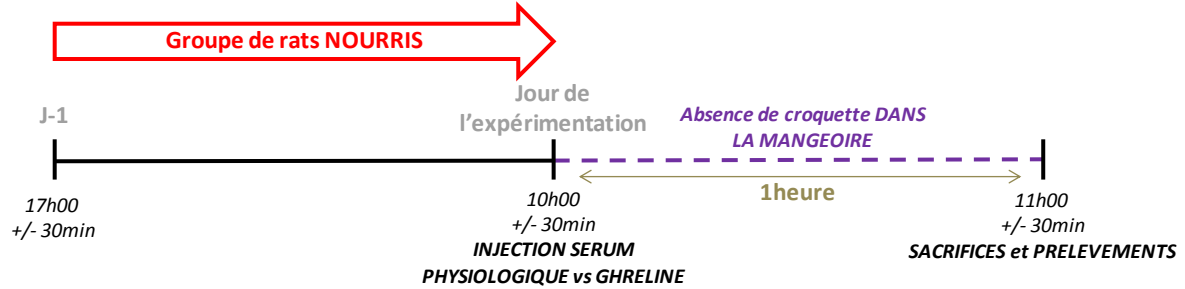
Le jour des expérimentations, les sacrifices et prélèvements se font le matin, autour de 10h00, au début de la phase diurne des rats (correspondant à leur phase de repos), et donc à l'issue de la principale période d'alimentation nocturne (pour les rats nourris *ad libitum*).

Protocole d'injection de glucose et de peptides régulant la prise alimentaire (Figure 30)

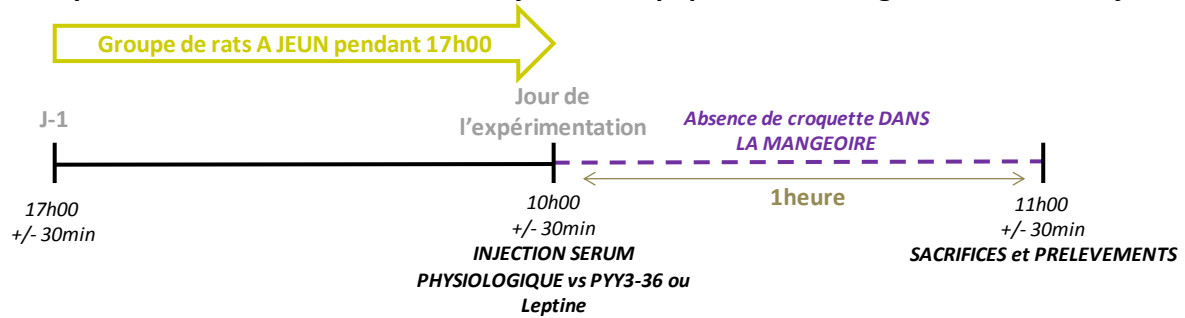
Le glucose et les différents peptides, orexigène (Ghréline) ou anorexigènes (PYY3-36 et leptine), sont dilués dans du sérum physiologique. Les injections sont réalisées par voie intra-péritonéales (i.p.) (1ml/kg de masse corporelle de rats) sur des rats nourris (pour les peptides orexigènes, afin de mimer un état de jeûne) ou à jeun depuis 17h (pour le bolus de glucose ou les peptides anorexigènes, afin de mimer un état de satiété). Les sacrifices/prélèvements sont réalisés 1h après les injections.

Afin d'étudier uniquement l'impact des injections des différents peptides ou du bolus de glucose sur la plasticité des astrocytes glomérulaires, les rats ne sont pas réalimentés après les injections. C'est pourquoi, directement après l'injection, les croquettes des groupes de rats à jeun ne sont pas remises dans la mangeoire et celles du groupe de rats nourris sont retirées.

Groupe « GHRELIN » : Injection d'un peptide orexigène à des rats rassasiés



Groupes « PYY3-36 » / « LEPTINE » : Injection de peptides anorexigènes à des rats à jeun



Groupe « GLUCOSE » : Injection de glucose à des rats à jeun

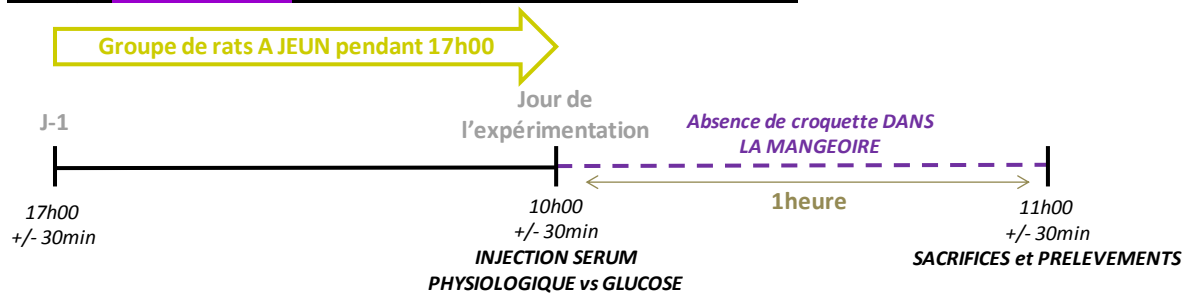


Figure 30: Protocole d'injection de glucose et de peptides régulant la prise alimentaire

Etude de l'impact des peptides régulant la prise alimentaire sur la plasticité morphologique des astrocytes glomérulaires :

3 groupes distincts de 12 rats ont été étudiés, correspondant aux trois peptides testés :

- Un groupe dit « Ghréline » composé de rats nourris *ad libitum* auxquels a été injecté soit du sérum physiologique (rats contrôles – n= 6 rats) soit la ghréline orexigène (40 µg/kg (Wren et al., 2000) – *PolyPeptide SC1356* - n= 6 rats).
- Un groupe dit « PYY3-36 » composé de rats à jeun pendant 17h auxquels a été injecté soit du sérum physiologique (rats contrôles – n= 6 rats) soit le PYY3-36 anorexigène (100µg/kg (Batterham et al., 2004) – *Bachem H-6042* - n= 6 rats).
- Un groupe dit « Leptine » composé de rats à jeun pendant 17 heures auxquels a été injecté soit du sérum physiologique (rats contrôles – n= 6 rats) soit la leptine anorexigène (25µg/kg (Patel and Ebenezer, 2008) – *Biovision 4368* – n= 6 rats).

L'efficacité des injections a été contrôlée en amont par la mesure de la prise alimentaire des rats après injection des peptides. Les croquettes étant retirées de la mangeoire (pour l'heure qui suit les injections) le jour des injections et sacrifices/prélèvements, des tests préliminaires ont donc été réalisés en présence de croquettes, pour chaque groupe, une semaine avant le début des expérimentations, sur ces mêmes rats, en suivant le même protocole d'injection, sans euthanasie.

Etude de l'impact des variations glycémiques sur la plasticité morphologique des astrocytes glomérulaires :

1 groupe de 14 rats a été réalisé :

- Un groupe dit « glucose » composé de rats à jeun pendant 17 heures auxquels a été injecté soit du sérum physiologique (rats contrôles – n= 6 rats) soit un bolus de glucose (2g/kg – *solution de glucose à 30% préparée dans du sérum physiologique* – n= 8 rats).

L'efficacité d'injection est contrôlée grâce à la mesure de la glycémie des rats avant injection du glucose puis 1heure après. L'objectif étant d'obtenir chez les rats en restriction alimentaire depuis 17heures, après injection et sans réalimentation, une glycémie proche de rats nourris *ad libitum*.

2. Modèles ex vivo

Le modèle expérimental utilisé est un modèle de tranches de BO maintenues en survie dans une solution de liquide céphalo-rachidien artificiel (ACSF), auxquelles différents traitements pharmacologiques ont été appliqués afin d'étudier leurs effets sur le réseau astrocytaire glomérulaire. Cette méthode permet de contrôler l'environnement en ions, en neurotransmetteurs

ou en hormones des cellules étudiées tout en préservant les interactions cellulaires locales (réseaux neuronaux et astrocytaires, interactions neurones-glie).

a. Dissection et réalisation des tranches de BO au vibratome

Les rats sont euthanasiés par décapitation. Les BO sont rapidement prélevés et transférés dans une solution d'ACSF froid (2-5 °C) enrichie en sucrose (s-ACSF en mM : 250.0 sucrose ; 2 KCl ; 7.0 MgCl₂ ; 0.5 CaCl₂ ; 1.2 NaH₂PO₄ ; 11.0 glucose ; 26.0 NaHCO₃ ; 310 mOsm ; pH 7.4) et équilibré avec du carbogène (95% O₂ / 5% CO₂). Le s-ACSF contient des concentrations largement réduites en ions sodium, calcium et potassium, compensées par la présence du sucrose (cryoprotecteur, qui maintient en outre l'osmolarité de l'ACSF). Cette solution qui comprend une concentration accrue en ions magnésium favorise la préservation et la survie du tissu cérébral pendant les étapes de dissection et de préparation des tranches, en limitant l'excitotoxicité glutamatergique et les phénomènes de gliose.

Les BO sont coupés en tranches coronales de 250 µm (une vingtaine de coupes coronales par BO) au moyen d'un vibratome (Leica VT12C05) dont la cuve est remplie de s-ACSF froid et oxygéné. Les tranches de BO sont récupérées puis placées au fur et à mesure dans un milieu ACSF standard (ACSF en mM : 126.0 NaCl ; 3.5 KCl ; 1.3 MgCl₂ ; 2.0 CaCl₂ ; 1.2 NaH₂PO₄ ; 11.0 glucose ; 26.0 NaHCO₃ ; 310 mOsm ; pH 7.4) carboxygéné et maintenues à 37°C pendant 30-45 minutes afin d'assurer une récupération optimale du tissu.

b. Traitement pharmacologique des tranches de BO pour l'étude des mécanismes impliqués dans les modifications morphologiques des astrocytes glomérulaires

Les tranches sont ensuite réparties dans différentes chambres de conservation permettant de maintenir les tranches sous oxygénation dans de l'ACSF en présence de différents agents pharmacologiques, pendant une heure, à température ambiante.

L'ensemble des traitements pharmacologiques utilisés dans le cadre de ces expérimentations est présenté dans la figure 31.

| PEPTIDES | FONCTION | CONCENTRATION | REFERENCE |
|---|--|---------------|----------------------|
| Leptine | Peptide anorexigène | 1.10-7 M | Biovision - 4368 |
| Peptide Tyrosine Tyrosine 3-36 (PYY3-36) | Peptide anorexigène | 1.10-7 M | Bachem – H-6042 |
| Ghréline | Peptide oréxigène | 3.10-8 M | PolyPeptide – SC1356 |
| Neuropeptide Y (NPY) | Neuropeptide oréxigène | 1.10-6 M | PolyPeptide – SC115 |
| Tetrodotoxine (TTX) | Inhibiteur des canaux sodique | 1.10-5 M | Latoxan – L8503 |
| (1S,3R)-1-Acide Aminocyclopentane-1.3- | Agoniste du groupe I et II des récepteurs métabotropiques du | 2.10-5 M | Tocris - 0284 |

Figure 31: Traitement pharmacologique des tranches de BO pour l'étude des mécanismes impliqués dans les modifications morphologiques des astrocytes glomérulaires

Traitements des tranches de BO aux peptides régulant la prise alimentaire

Dans le but d'étudier les effets d'une application directe des peptides régulant la prise alimentaire sur la plasticité morphologique des astrocytes glomérulaires, les tranches de BO ont été incubées 1h dans de l'ACSF contenant :

- de la ghréline ($3 \cdot 10^{-8}M$) ou du NPY ($1 \cdot 10^{-6}M$) orexigènes.
- du PYY3-36 ($1 \cdot 10^{-7}M$) ou de la leptine ($1 \cdot 10^{-7}M$) anorexigènes.

Traitement des tranches de BO dans un milieu hypoglycémique

Dans le but d'étudier l'impact d'un environnement hypoglycémique sur la plasticité morphologique des astrocytes glomérulaires, les tranches de BO ont été incubées 1h dans un ACSF dont la concentration de glucose était abaissée de 11mM (ACSF standard) à 5mM ou 2.5mM.

Traitement des tranches de BO au tACPD et TTX

Dans le but d'étudier l'influence des variations d'activité synaptique glutamatergique sur la plasticité morphologique des astrocytes glomérulaires, les tranches de BO ont été incubées 1h dans un ACSF contenant :

- un agoniste sélectif des récepteurs métabotropiques au glutamate de type I présents sur les astrocytes, le (1S,3R)-1-Acide Aminocyclopentane-1.3-dicarboxylique (tACPD ; $2 \cdot 10^{-5}M$).
- de la tétródotoxine (TTX ; $1 \cdot 10^{-5}M$), une toxine qui bloque sélectivement les canaux sodiques voltage-dépendants des neurones, inhibant ainsi leurs potentiels d'actions et l'activité synaptique résultante.

II. Etude des paramètres physiologiques des modèles *in vivo*

1. Etude des variations pondérales

Les variations pondérales des animaux, sont calculées sur une période de 48 heures. Tous les rats sont pesés en même temps, une première fois avant le début des différents protocoles de mise à jeun, puis une deuxième fois avant l'euthanasie et les prélèvements. Le calcul de la différence de poids nous permet d'évaluer la perte pondérale due aux différents traitements de restriction alimentaire.

2. Contrôle de la prise alimentaire

Les mesures de prise alimentaire, exprimée en grammes (g), sont effectuées par les pesées des croquettes présentes dans la mangeoire. Celles-ci sont effectuées juste avant l'injection i.p. des peptides orexigènes/anorexigènes, puis 1heure après l'injection. Le calcul de la différence de ces deux mesures permet de vérifier l'efficacité d'injection des peptides orexigènes et anorexigènes.

3. Mesure de la glycémie

Afin d'évaluer les variations glycémiques dans nos différents modèles *in vivo*, la glycémie sanguine des animaux est mesurée avant et après chaque traitement, et/ou avant l'euthanasie. Le sang est prélevé par micro-incision au niveau de la veine caudale de l'animal et la glycémie est mesurée (en mg/dl) grâce à un glucomètre Accu-Chek Performa (*Dextro*).

4. Mesure de la leptinémie

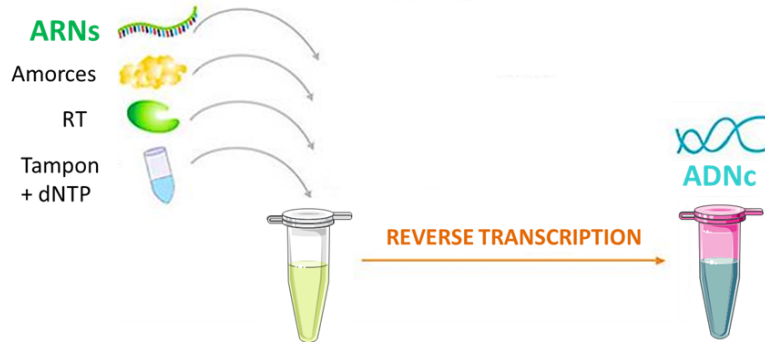
Le sang collecté au moment de l'euthanasie de l'animal, dans des tubes d'EDTA évitant la coagulation, est centrifugé à 3000 rpm à 4 °C pendant 10 minutes. Le plasma est isolé et conservé au congélateur à - 80 °C.

Le dosage de la leptine plasmatique est effectué grâce au kit ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay) pour leptine de rat (*Crystal Chem Inc.*). La leptine est détectée par un anticorps spécifique couplé à la peroxydase (HRP : horse radish peroxidase) dont l'activité est révélée par une réaction colorée en présence du substrat tétraméthylbenzidine. La mesure de l'absorbance à 450nm corrigée par une mesure à 620nm permet le calcul des concentrations de leptine (ng/mL) des échantillons plasmatiques étudiés, selon une régression non linéaire *cubic spline* (sous le logiciel GraphPad Prism 5).

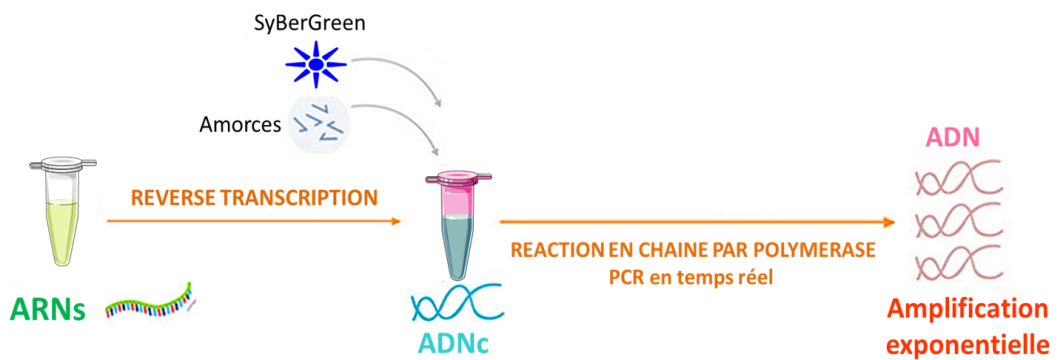
5. Analyse du comportement de recherche alimentaire

Le test de comportement de recherche alimentaire consiste à cacher de la nourriture sous la litière et à mesurer le temps nécessaire aux animaux pour retrouver la nourriture cachée ainsi que le temps qu'ils passent à la flairer. Ce test a été utilisé dans l'étude des modèles de mises à jeun des rats (rats

Reverse transcription des ARNs en ADNc



Amplification par PCR quantitative en temps réel



Détermination de l'expression du gène d'intérêt

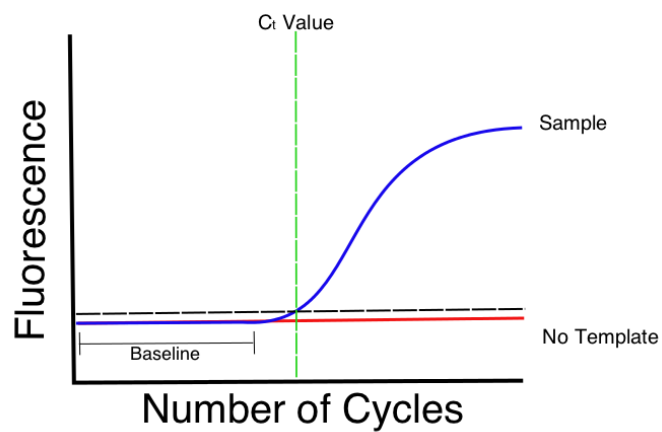


Figure 32: Présentation des étapes de la RT-PCR quantitative en temps réel pour la quantification des ARNm

nourris *ad libitum* versus A jeun 17h, 24h et 48h) afin d'étudier la motivation des rats à chercher la nourriture ainsi que de tester leurs acuités olfactives.

Le jour des expérimentations, les croquettes de la mangeoire des rats du groupe « nourris » sont retirées 3 heures avant le début des tests de comportements afin de les habituer à ne plus avoir de croquette dans la mangeoire, comme pour les animaux des groupes « à jeun ». Au début de chaque test, les animaux sont placés seuls, dans des cages propres afin qu'ils ne soient plus en présence des odeurs de leur compagnon de cage, et ceci dans une salle sans odeurs alimentaires. On dépose 4 à 5 croquettes dans une boule à thé, cachée dans la sciure. L'activité des rats est filmée pendant 15 minutes, puis l'analyse *post-hoc* des vidéos permet de quantifier le temps de flairage, exprimé en pourcentage du temps total. Toutes les expériences ont été réalisées pendant la phase d'inactivité des animaux, à 14h.

6. Etude de l'expression des peptides hypothalamiques : Quantification des ARNm par réaction en chaîne par polymérase en temps réel (RT-PCR en temps réel)

La technique de RT-PCR quantitative en temps réel a été utilisée dans le but de mesurer le niveau d'expression des ARNm des peptides hypothalamiques impliqués dans la régulation de la prise alimentaire : NPY, Y2R, POMC, MC4R, CRH, AgRP.

Principe de la PCR quantitative en temps réel

La PCR en temps réel est une technique qui permet l'amplification de l'ADN grâce à une enzyme : l'ADN polymérase, et sa quantification en « temps réel » grâce à une sonde fluorescente : la sybrGreen. La SyBrGreen est un agent intercalant de l'ADN nouvellement synthétisé qui, sous une excitation aux UV émet un signal fluorescent mesuré instantanément pendant la réaction PCR (« en temps réel ») et qui est directement proportionnelle à la quantité d'amplicons produits.

Utilisation de la RT-PCR quantitative en temps réel pour la quantification des ARNm

La quantification des ARNm par la technique de PCR en temps réel classique, nécessite une étape préliminaire de rétro-transcription (RT) des ARNm en ADN complémentaire (ADNc). L'ADNc obtenu est alors utilisé comme matrice pour la technique de PCR et permet ainsi de quantifier indirectement l'expression des ARNm d'intérêts dans nos échantillons.

Le protocole de la RT-PCR en temps réel se décompose en plusieurs étapes successives décrites ci-après (Figure 32) :

- Extraction des ARNm du tissu

- Rétro-transcription des ARNm en ADNc
- Amplification des ADNc par PCR en temps réel
- Quantification des ARNm d'intérêt à partir des résultats de PCR en temps réel des ADNc

a. Extraction des ARNm de l'hypothalamus

Après l'euthanasie des rats les hypothalamus sont prélevés à l'aide d'outils stériles puis placés dans un tube contenant 1 ml de Trizol™ (Invitrogen, Carlsbad, CA). Les échantillons peuvent être congelés dans l'azote liquide et conservés à -80°C. Après homogénéisation des hypothalamus au broyeur à billes (Tissue lyser, Qiagen, Courtaboeuf, France), les ARN totaux sont extraits grâce au trizol™ et leur concentration mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre Nanodrop (Labtek, Paris, France) par mesure de l'absorbance à 260 nm, valeur correspondant à la longueur d'onde d'absorption des acides aminés. De la même manière, l'absence de contamination par des protéines ou des composants organiques est vérifiée et calculée grâce aux ratios 260nm/280nm et 260nm/230nm respectivement. La pureté des échantillons est établie pour des valeurs supérieures à 1,8.

b. Rétrotranscription des ARNm en ADNc

La rétrotranscription des ARNm en ADNc est réalisée avec un kit spécifique : le « *High capacity reverse transcription kit* » (Applied Biosystems, Foster City, CA). Pour chaque échantillon, 400ng d'ARN totaux sont rétro-transcrits dans un mélange réactionnel contenant du tampon de rétrotranscription, un mélange de dinucléotides (dNTP), des amorces aléatoires et l'enzyme reverse transcriptase (50U/μl). La réaction de polymérisation se réalise dans un thermocycleur à 25°C pendant 10 minutes, puis à 37°C pendant 2h. L'ADNc obtenu est ensuite conservé à -20°C avant utilisation.

c. Amplification par PCR quantitative en temps réel des ADNc

Chaque échantillon d'ADNc (2.5μl) est amplifié dans un mélange réactionnel (7.5μl) contenant la sonde fluorescente SyBrGreen (Fast SyBrGreen Master mix 2x, Applied Biosystems, Foster City, CA), les amorces d'oligonucléotides sens et anti-sens spécifiques d'un gène (0.015 nM/μl) et de l'eau additionnée d'inhibiteurs de RNase. Chaque mélange réactionnel d'ADNc est déposé en duplicat sur une plaque à PCR. Les amorces d'oligonucléotidiques (Eurogentec) ont été recherchées grâce au logiciel «Primer Express» et le gène 18S est utilisé pour normaliser la quantité d'ARNm de chaque gène. Les couples d'oligonucléotides utilisés ont été choisis pour être spécifiques de l'ensemble des transcrits et sont présentées dans la figure 33.

Chaque cycle de PCR est constitué de trois étapes (Figure 34) :

- une phase de dénaturation de l'ADN par la chaleur pour séparer les deux brins d'ADN,
- une phase d'hybridation des amorces d'oligonucléotidiques aux extrémités de la séquence recherchée,
- une phase d'élongation grâce à l'action de l'enzyme d'ADN polymérase.

Ce cycle est répété un grand nombre de fois pour obtenir une multiplication exponentielle de la séquence d'ADN cible. Les données de fluorescence de l'incorporation de la sonde SybrGreen sont collectées à chaque cycle de la PCR par un automate (7300 de chez Applied Biosystems™ Foster City, CA) et représentent la quantité de produit amplifié à cet instant.

A la fin des cycles de PCR, une courbe de dissociation est réalisée pour analyser les amplicons produits et s'affranchir d'éventuelle contamination par de l'ADN génomique ou par la formation de dimères d'amorces. Deux témoins réalisés au cours de la rétro-transcription sont testés : un témoin généré sans l'enzyme et un témoin généré sans ARN. L'efficacité de PCR est calculée pour chaque couple d'amorces à partir de la pente déterminée à l'aide d'une courbe étalon réalisée avec un « pool » d'ADNc ($E = 10^{-1/\text{pente} - 1}$). Tous les ADNc sont amplifiés avec une efficacité supérieure à 98%.

d. Quantification des ARNm d'intérêt

L'expression du gène d'intérêt (ARNm) est quantifiée grâce à la mesure du cycle seuil (Ct) d'apparition du produit d'amplicon qui représente le cycle pour lequel le signal fluorescent est supérieur au seuil de détection, selon la formule $2^{-\Delta Ct}$ avec $\Delta Ct = (\text{Ct gène d'intérêt} - \text{Ct du gène de référence})$. Il est déterminé en début de phase exponentielle de la PCR. Plus le Ct est faible et plus l'amplification exponentielle de la cible est précoce et inversement plus le Ct est grand et moins la quantité de cible est importante.

| Gènes cibles | séquence | |
|--------------|----------|--------------------------------|
| NPY | Sens | 5'-CTCTGCGACACTACATCAATCTCA-3' |
| | Antisens | 5'-GTGTCTCAGGGCTGGATCTCTT-3' |
| Y2R | Sens | 5'-GAGCTGCAAGTGACCATTACCA-3' |
| | Antisens | 5'-CGCACACGAGCATTTTGG-3' |
| POMC | Sens | 5'-GGCGTTTCCCCTAGAGTTCAA-3' |
| | Antisens | 5'-GTCGGCCTTCTCGGTATCC-3' |
| MC4R | Sens | 5'-GGGAAAGCCACAAAAACGA-3' |
| | Antisens | 5'-GGCGTACTGAAAGCTCACTCT-3' |
| CRH | Sens | 5'-CCGCAGCCGTTGAATT-3' |
| | Antisens | 5'-TTCTTCACCCATGCGGATCA-3' |
| AgRP | Sens | 5'-CCATATAAGCTCAGGGCACAAGT-3' |
| | Antisens | 5'-CATGGCCTTTGCTTGTTGATC-3' |
| 18S | Sens | 5'-ACGGAAGGGCACCACCAGGAG-3' |
| | Antisens | 5'-GCACCACCACCCACGGAAACG -3' |

Figure 33: Séquence des couples d'amorces d'oligonucléotidiques, sens et anti-sens, spécifiques des gènes étudiés

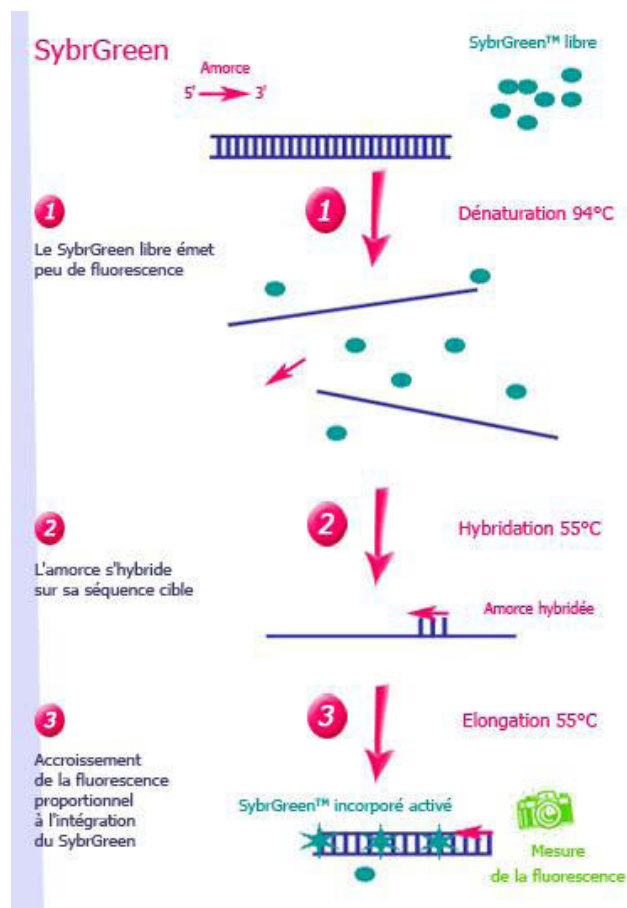


Figure 34: Description des étapes d'amplification par PCR quantitative en temps réel des ADNc avec la sonde fluorescente *SyberGreen*

Source: LABO 2000 « PCR en temps réel »

III. Caractérisation *in vivo* et *ex vivo* de la plasticité morphologique des astrocytes glomérulaires du BO de rat

Afin d'étudier la plasticité morphologique des astrocytes au niveau des glomérules du BO, nous avons analysé de façon quantitative la présence de la protéine GFAP au sein de chaque glomérule. Pour cela nous avons utilisé un protocole de marquage immunohistochimique classique détaillé ci-dessous.

1. Prélèvement et fixation des BO

Le but de la fixation est de maintenir les tissus ou les organes prélevés dans un état proche de l'état *ante mortem*. Au cours de cette étude, deux méthodes de fixation ont été utilisées : une fixation par immersion directe des BO et/ou des tranches de BO dans du paraformaldéhyde à 4% (PFA 4%) (*ex vivo*) ou une fixation de l'animal entier par perfusion intra-cardiaque de PFA 4% (*in vivo*).

a. Fixation par immersion

BO intacts

Après euthanasie et dissection, les BO sont délicatement et rapidement prélevés puis directement plongés dans du PFA4% pendant 24h à 4°C. Les BO sont ensuite transférés dans une solution cryoprotectrice de sucrose à 30 % dans de l'eau ultrapure pour la réalisation des coupes au cryostat.

Tranches de BO

Après incubation en présence des différents traitements pharmacologiques, les tranches coronales de BO sont délicatement transférées dans du PFA4%, sous hotte, pendant 1h à température ambiante. Les tranches sont ensuite soigneusement rincées à plusieurs reprises dans du PBS 0.1M (PBS pour Phosphate salin buffer) afin d'éliminer toute trace de PFA et conservées à 4°C dans du PBS 0.1M jusqu'au début des protocoles d'immunohistochimie.

b. Fixation par perfusion intra-cardiaque

Les rats sont anesthésiés par injection intrapéritonéale (i.p) de pentobarbital de sodium à dose sub-létale (1.3ml/kg de poids corporel). Après vérification de l'état d'anesthésie du rat, la dissection et la perfusion intra-cardiaque au travers du ventricule gauche et de l'aorte de l'animal sont rapidement réalisées. On perfuse dans un premier temps 150 ml d'une solution de rinçage NaCl/Nitrite à 37°C (9g NaCl et 10g Nitrite, dans 1 L d'eau osmosée), puis dans un second temps 150 à 200 ml de PFA 4% froid pour la fixation des différents organes.

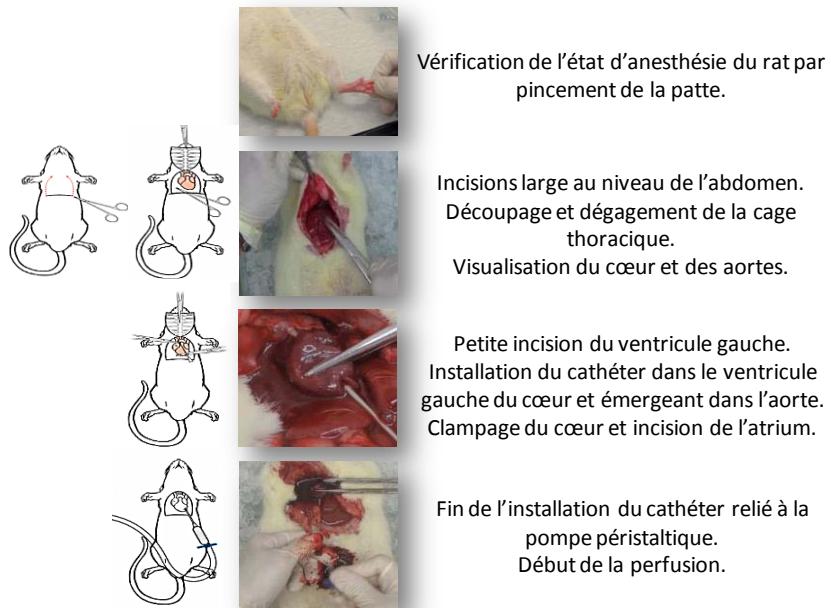
Les BO fixés sont ensuite délicatement prélevés et post-fixés dans du PFA 4% pendant 4h à température ambiante, puis transférés dans une solution cryoprotectrice de sucrose à 30% dans de l'eau ultrapure à 4°C jusqu'à imprégnation des tissus (environ 24h) (figure 35).

2. Coupes histologiques des BO au cryostat

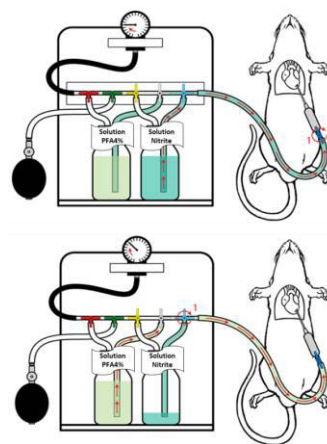
Après congélation rapide des BO (inclus dans de l'OCT (Optimum Cutting Temperature) - *Tissue-Tek*®) dans de l'isopentane froid (-35 à -40°C), des coupes sériées horizontales de 20µm d'épaisseur sont réalisées au cryostat à -20°C, montées directement sur lames de verre gélatinées et conservées à -20°C pour éviter toute dégradation de la GFAP.

Environ 130 coupes horizontales successives sont réalisées à partir de la surface dorsale du BO et représentent la quasi-totalité de la hauteur d'un bulbe (Figure 36). Nous conservons successivement les 30 premières coupes (en région dorsale) qui sont alors réparties alternativement sur 10 lames. Les 15 coupes suivantes sont éliminées, puis 30 coupes (en région médiane) sont à nouveau récupérées et positionnées sur 10 lames alternativement. 15 coupes sont ensuite éliminées et les 40 dernières coupes (en ventrale) sont conservées comme précédemment. Ainsi, pour chaque BO 3 séries de 10 lames sont récupérées et correspondent respectivement aux coupes des régions dorsales, médianes et ventrales. Pour chaque BO, le marquage immunohistochimique de la GFAP est réalisé sur les 3 régions du bulbe.

Installation de la pompe péristaltique



Perfusion



Etape d'exsanguination des tissus:

Perfusion à 25ml/min avec une solution de préfixation NaCl/Nitrite à 37°C

Etape de fixation des tissus:

Perfusion à 25ml/min de 200ml/rats de solution de paraformaldéhyde à 4% dans du PBS

Récupération des BO

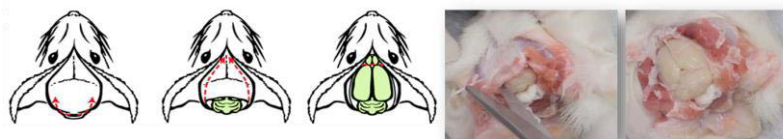


Figure 35: Description du protocole de fixation par perfusion intra-cardiaque chez le rat

Adapté de Gage G.J. et al. (2012)

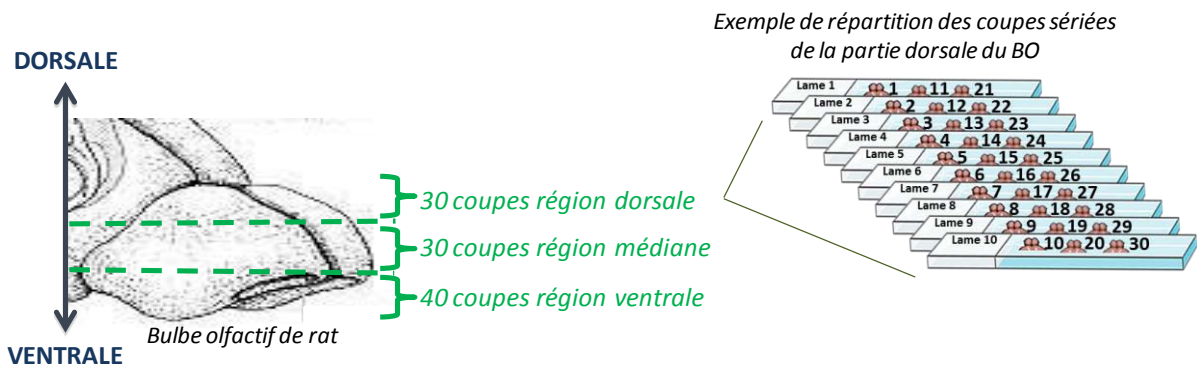


Figure 36: Orientation des coupes histologiques de bulbe olfactif de rat et répartition des coupes sur lames

3. Marquage immunohistochimique (Figure 37)

Le protocole d'immunohistochimie est réalisé sur lame pour les coupes de BO de 20 μ m : « coupes sur lame » (*in vivo*) ou dans des puits pour les tranches de 250 μ m : « tranches flottantes » (*ex vivo*). Les coupes sont préalablement rincées 2 fois dans une solution de PBS 0.1M, Triton 0.3% (Sigma, T-9284) pH 7.4 (PBST). Le triton permet la perméabilisation des membranes. Les sites non spécifiques sont saturés par une incubation à température ambiante, dans du PBST 0.1M pH 7.4 contenant 2% d'Albumine de Sérum de Bovin (BSA) (Sigma, A2153-100G) pendant 30 minutes sous agitation pour les « tranches flottantes » ou 2 heures sous hotte pour les « coupes sur lame ».

Les coupes et tranches sont ensuite incubées dans une solution de PBST contenant 0.2% de BSA additionnée de l'anticorps monoclonal GFAP (anti-glial fibrillary acidic protein) directement couplé à la cyanine-3 (Sigma, C9205), et dilué au 1/1000^{ème}. Simultanément les noyaux sont marqués par de la bis-benzimide, dilué à 0.5 μ g/ml (Hoechst, Sigma, France) qui se lie spécifiquement aux régions riches en bases AT de l'ADN. Les « coupes sur lame » sont incubées pendant 1 à 2 heures à température ambiante et les « tranches flottantes » la nuit à 4°C.

Plusieurs rinçages sont ensuite réalisés dans du PBS 0.1M. Les « coupes sur lame » sont rincées avec de l'eau ultra pure avant d'être montées entre lame et lamelle avec du milieu de montage pour fluorescence (Dako). Les « tranches flottantes » sont montées sur lame gélatinées, séchées plusieurs heures à température ambiante à l'obscurité, puis rincées avec de l'eau ultra-pure et montées entre lame et lamelle avec du Dako. Après le montage, les lames sèchent à température ambiante à l'obscurité pendant 48h, avant leur observation au microscope.

La visualisation de la GFAP est possible grâce au fluorochrome Cy3 couplé à l'anticorps, excitable à une longueur d'onde (λ) de 552nm et qui émet sa fluorescence autour de 570 nm.

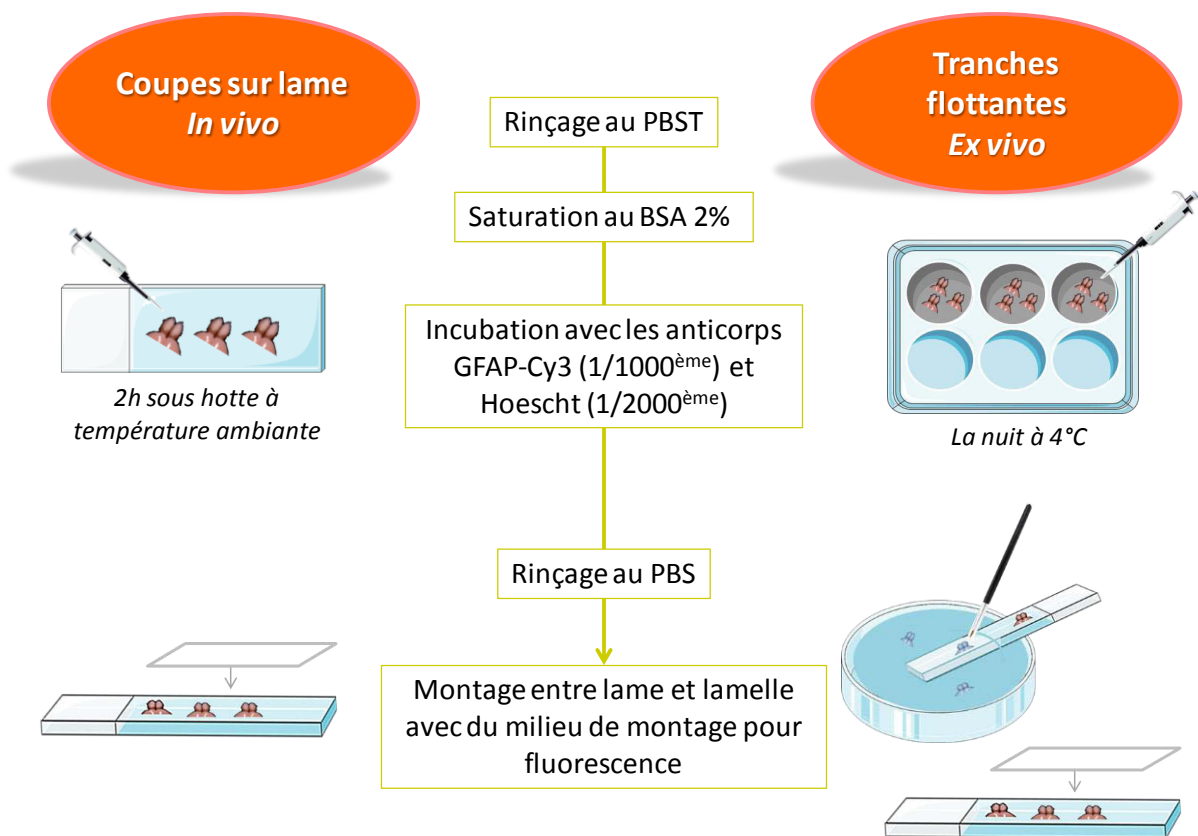


Figure 37: Protocole du marquage immunohistochimique de la GFAP et du Hoechst, des coupes sur lame (*in vivo*) et des tranches flottantes (*ex vivo*)

4. Traitements et analyses des images pour l'étude de la morphologie des astrocytes glomérulaires

a. Acquisition des images des coupes (in vivo) et des tranches (ex vivo) de BO marquées pour la GFAP et les noyaux

Acquisition des images des coupes de BO de 20 μ m (In vivo)

L'acquisition des images fluorescentes des coupes marquées par la GFAP ($\lambda_{\text{excitation}}$: 550 nm - $\lambda_{\text{émission}}$: 570 nm) et les noyaux ($\lambda_{\text{excitation}}$: 350 nm - $\lambda_{\text{émission}}$: 510 à 540 nm) est réalisée grâce à un scanner de lame à fluorescence (*Pannoramic SCAN P150, 3D HISTECH*) à l'objectif X20. Chaque scan de la GFAP est effectué sur 21 plans successifs en Z à la verticale, espacés de 0.4 μ m et compilés automatiquement en une seule image sur 1 plan (fonction *extended focus* du logiciel *pannoramic scanner*). Ce paramètre permet de visualiser dans la profondeur de la coupe, avec une plus grande netteté, l'ensemble des filaments GFAP. Cette méthode de prise d'image de la GFAP est essentielle pour la précision de sa quantification.

Les prises de vue de chaque coupe de BO sont ensuite réalisées à partir du logiciel *PannoramicViewer*. Par coupe une quinzaine de photos centrées sur la couche glomérulaire sont prises au grossissement 20X et enregistrées en format TIFF (figure 38)

Acquisition des images des tranches de BO de 250 μ m (Ex vivo)

En raison de l'épaisseur des tranches de BO (250 μ m), l'acquisition automatique en fluorescence par le scanner de lame n'est plus adaptée et engendre des artefacts de mise au point et de netteté sur les images. Par conséquent, l'acquisition des photos est réalisée manuellement, sur un microscope inversé (*Olympus IX71*) équipé d'une station d'imagerie (CellR) en épifluorescence pilotée par le logiciel XcellenceRT (Olympus, Soft Imaging Solutions - OSIS, Münster, Allemagne). Les acquisitions d'images ont été réalisées au moyen d'une caméra CCD Orca-ER (Hamamatsu Photonics, Massy, France) au travers d'un d'objectif 40X à immersion à huile. Une première photo des noyaux est réalisée, puis plusieurs images successives de la GFAP sont ensuite prises depuis la surface du glomérule et en descendant peu à peu dans la profondeur de la coupe. En moyenne, une dizaine de prises de vue pour la GFAP sont réalisées. De cette manière, on prend en compte l'ensemble des prolongements astrocytaires de la surface à l'intérieur d'un glomérule.

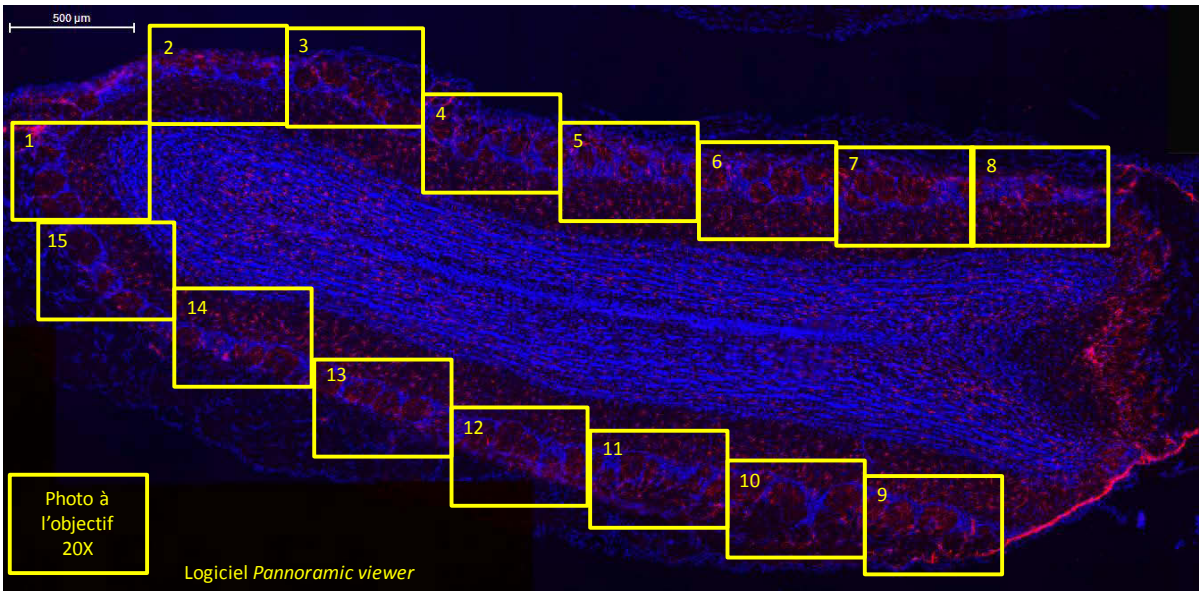


Figure 38: Prises de vue des coupes de bulbe olfactif à l'objectif 20X à partir du logiciel *PannoramicViewer*

b. Quantification du pourcentage de l'aire GFAP au sein des glomérules (Figure 39)

L'ensemble des photos est analysé avec le logiciel *ImageJ*. La fonction stack nous permet de combiner en une projection sur une seule photo la succession des photos GFAP d'un glomérule. Les zones d'intérêt (R.O.I) correspondants aux glomérules sont délimitées grâce au marquage des noyaux. Le déploiement astrocytaire par glomérule est ensuite quantifié grâce à la mesure du pourcentage de l'aire occupée par le marquage GFAP sur l'aire totale du glomérule. L'aire du marquage GFAP est calculée pour un seuil d'intensité fixé, selon l'algorithme « Li » (Li and Lee, 1993) qui permet de prendre en compte, avec précision, l'ensemble du marquage GFAP.

Sur coupes

Pour chaque BO, environ 7 coupes sont analysées : 2 coupes dorsales, 2 coupes médianes et 3 coupes ventrales. Pour chaque coupe, le pourcentage de GFAP par glomérule est analysé sur la totalité des glomérules visibles sur chaque coupe (environ 60 glomérules/coupe, pour un total d'environ 420 glomérules analysés/rat).

Sur tranches

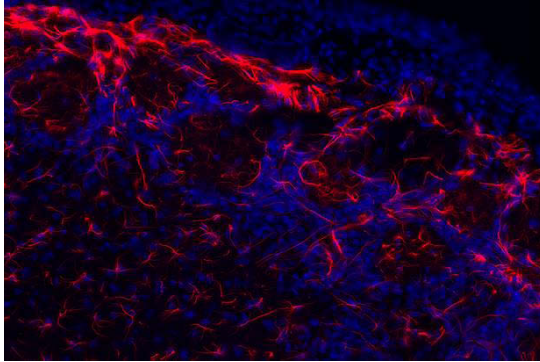
Pour chaque tranche, environ 3 glomérules sont analysés : un glomérule par région du bulbe (dorsale, médiane et ventrale).

c. Analyse du réseau astrocytaire au sein des glomérules

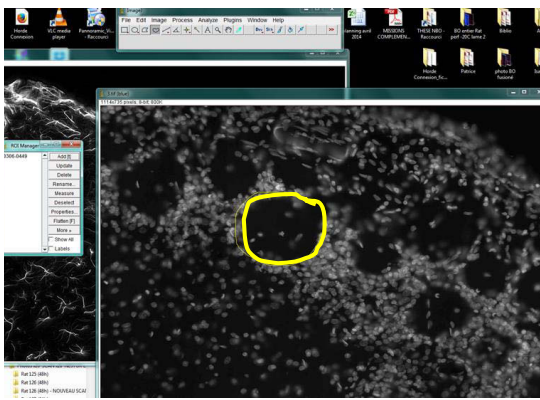
Le réseau astrocytaire au sein des glomérules est analysé grâce au plugin « Analyze Skeleton » (2D/3D) du logiciel *ImageJ*. Ce plugin permet de reconstruire en 2D et de quantifier le squelette formé par les prolongements marqués pour la GFAP permettant ainsi de compter toute les jonctions, branches, et longueur de branche d'un réseau.

Chaque image GFAP est binarisée en fixant le seuil d'intensité suivant l'algorithme « Li » puis « skeletonisée » grâce au filtre « skeleton ». L'image « squelette » composée de voxel (volumetric *pixel*) est ensuite automatiquement analysée par le plugin « AnalyzeSkeleton » (2D/3D) et les résultats sont répertoriés dans un fichier *Excel*.

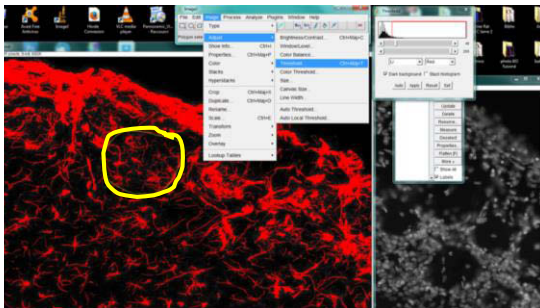
Au sein de chaque glomérule analysé, le réseau astrocytaire est donc caractérisé par la moyenne du nombre de branche, d'intersection et de longueur de branche (u.a). Le nombre de branches et



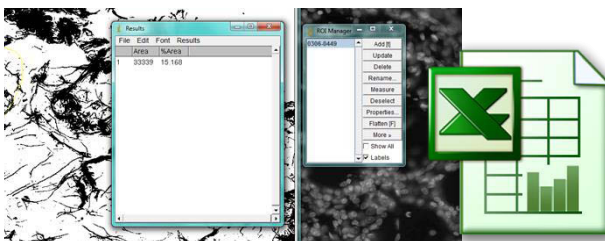
Prise de photo, des noyaux et de la GFAP, au 20X à partir du logiciel *PannoramicViewer*.



Délimitation du R.O.I correspondant à un glomérules, à partir de la photo des noyaux.



Détermination du seuil d'intensité et binarisation de l'image, à partir de la photo de la GFAP et grâce à l'algorithme « Li ».



Calcul du pourcentage du marquage GFAP au sein du glomérule par *imageJ*.

Figure 39: Protocole de quantification du pourcentage de l'aire GFAP au sein des glomérules, par le logiciel *ImageJ*

d'intersections est exprimé en fonction de l'aire du glomérule en u.a. Seules les branches composées d'un nombre de voxels supérieur à 2 sont analysées.

Le détail des différentes étapes d'utilisation du plugin « analyse skeleton » d'*imageJ* est illustré dans la figure 40.

IV. Analyse *in vivo* et *ex vivo* de la fonctionnalité du réseau astrocytaire glomérulaire

1. Analyse semi-quantitative de marqueurs protéiques astrocytaires (*in vivo*)

Une analyse semi-quantitative par western-blot a été réalisée afin d'étudier dans le BO le niveau d'expression de la protéine GFAP ou de marqueurs astrocytaires impliqués dans la régulation synaptique des neurones glutamatergiques : La glutamine synthétase (GS) et le transporteur astrocytaire du glutamate (GLAST).

a. Prélèvements des BO et préparation des échantillons

Après euthanasie des rats, les BO sont rapidement prélevés, pesés, placés dans du tampon de lyse composé de RIPA (*SIGMA*) additionné d'antiprotéase 1X (*ROCHE*) à raison de 10µl/mg de tissu, puis congelés à sec dans l'azote liquide pour une congélation rapide du tissu (pour éviter la dégradation des protéines), et conservés à -80°C. Les BO sont ensuite broyés sur glace dans le tampon de lyse jusqu'à homogénéisation de la suspension. Après 30 minutes de pause sur glace les échantillons de BO sont conservés à -80°C.

b. Dosage des protéines par la méthode DC Assay

Le kit Biorad DC-Protein Assay est un test colorimétrique, basé sur la méthode de Lowry, permettant de mesurer la concentration de protéines totales des échantillons. Ce test est basé sur la réaction entre les tyrosines et tryptophanes des protéines de l'échantillon, les ions cuivre en solution et le réactif de Folin, qui donne une coloration bleue. Après 15 minutes d'incubation, l'absorbance est

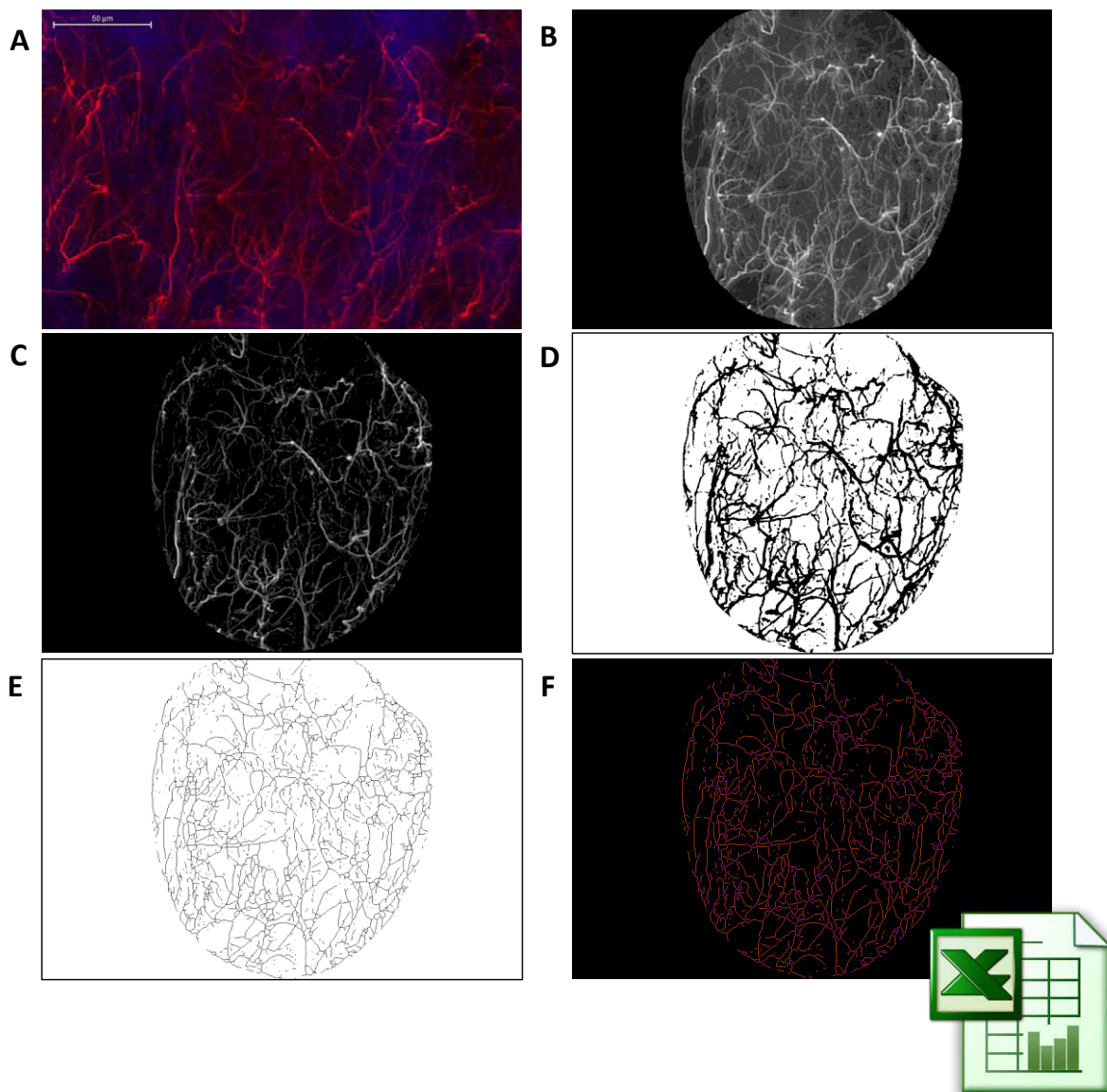


Figure 40: Description du protocole de traitement d'image par le logiciel *imageJ* pour l'analyse du réseau astrocytaire au sein des glomérules par le plugin *skeletonize d'imageJ*

A: Photo prise a l'objectif 40X d'un glomérule du bulbe olfactif immunomarcqué par la GFAP (rouge) et le hoechst (bleu)

B: Délimitation du R.O.I. correspondant au glomérule

C: Elimination du bruit de fond

D: Fixation du seuil d'intensité (Algorithme « Li »)

E: Application du filtre skeleton d'*imageJ*

F: Analyse automatique du réseau astrocytaire grâce au plugin « AnalyzeSkeleton » (2D/3D)

mesurée par spectrophotométrie (Técan) à 660 nm. Une gamme étalon d'Albumine de Serum Bovin (BSA) allant de 0 à 2 mg/mL est dosée en parallèle.

Les différentes étapes de l'analyse protéique par Western Blot sont résumées dans la figure 41.

c. Migration et transfert

Après dosage des protéines et avant d'être déposés sur gel, les échantillons sont dilués volume à volume dans une solution dénaturante SB2X (2,5 mL de Tris HCl 0,5 M ; pH 6,8 ; 2 mL de SDS 20% ; 2 mL de glycérol ; 50 µL de bleu de bromophénol 1% ; 3 mL d'eau ultra pure) additionnée de DTT 4M (50 µl pour 950 µL de SB2X). Ce tampon contient du SDS, détergent anionique qui dénature les protéines et les charge négativement, ainsi que du DTT, agent réducteur qui rompt les ponts disulfure des protéines.

Les échantillons ainsi que le marqueur de poids moléculaire (Precision Plus Protein™ Standards, All Blue, Biorad) sont déposés sur un gel Tris-HCl à gradient d'acrylamide 4-15% (Biorad). L'électrophorèse est réalisée dans du tampon de migration (25 mM Tris, 192 mM Glycine et 0,1% (w/v) SDS ; pH = 8,3) à 200 volts pendant 1h à température ambiante. Cette technique permet de séparer les protéines en fonction de leur poids moléculaire. Les protéines ainsi séparées sont transférées sur une membrane de PVDF (Polyvinylidene Fluoride Membrane, Immobilon-P, Millipore), préalablement perméabilisée par incubations successives dans de l'éthanol 100%, de l'eau ultra-pure et du tampon de transfert (25 mM Tris, 192 mM Glycine et 20% éthanol ; pH = 8,3). Le gel et la membrane sont placés entre des papiers Whatman et Scotch-Brit dans une cassette de transfert immergée dans une cuve contenant du tampon de transfert. Le transfert est réalisé à voltage constant de 30V à 4°C pendant 2 heures.

d. Hybridation et immunodétection

Après le transfert, la membrane est rincée dans du TBST (Tris 20 mM ; NaCl 0,8% ; pH 7,6 ; Tween 20 0,1%) puis incubée 2h à température ambiante sous agitation dans du TBST additionné de 5% de lait écrémé en poudre. Cette étape a pour but de bloquer les sites non spécifiques de la membrane susceptibles de fixer les anticorps. Les membranes sont ensuite incubées 2h à température ambiante (ou la nuit à 4°C) avec l'anticorps primaire spécifique de la protéine d'intérêt dilué dans du TBST-lait 5%. Après plusieurs rinçages successifs au TBST, les membranes sont ensuite incubées pendant 2h à température ambiante avec l'anticorps secondaire (couplé à l'HRP) dilué dans du TBST-lait 5%. Les différents anticorps utilisés sont présentés dans la figure 42.

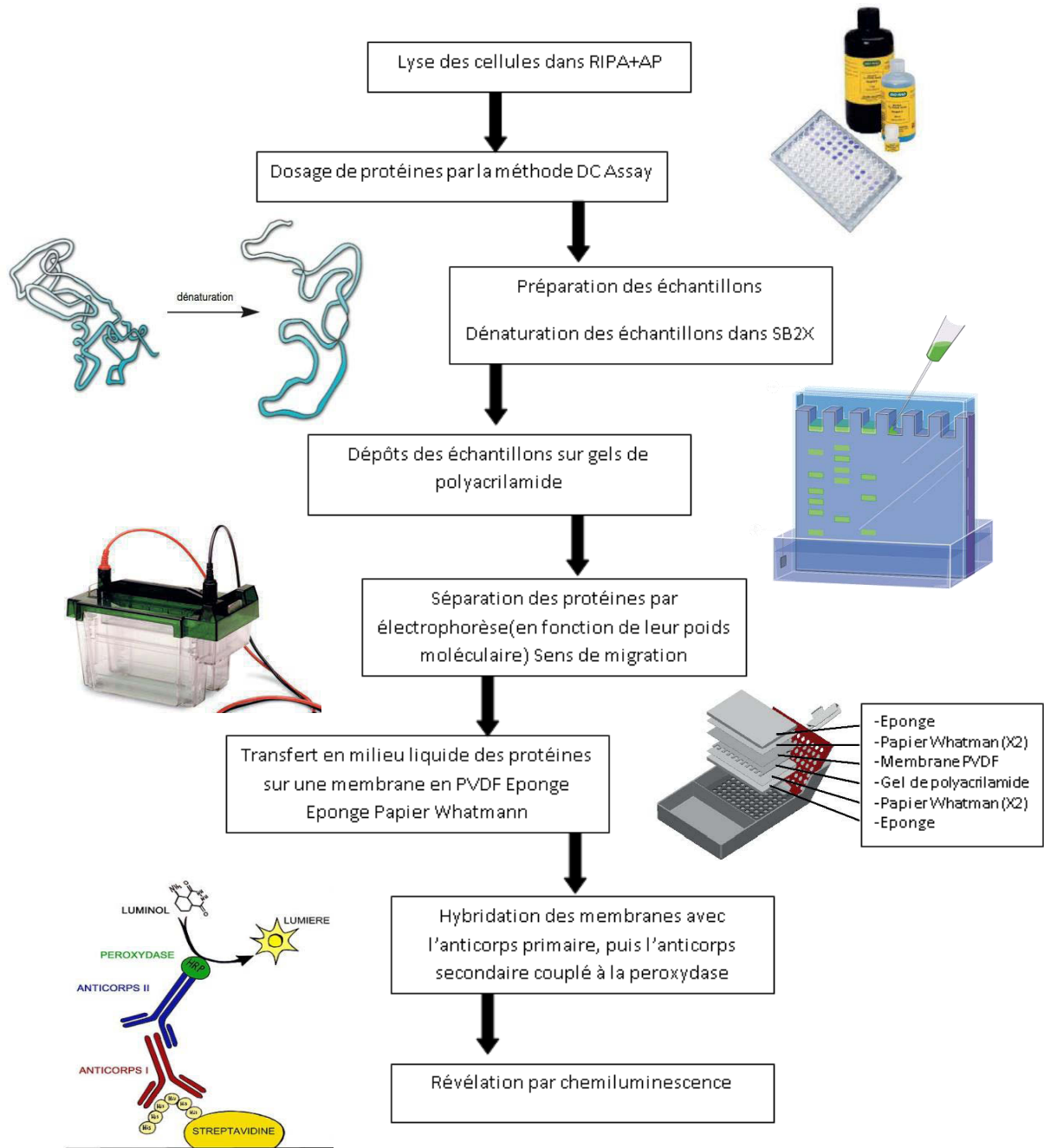


Figure 41: Principe général de l'analyse protéique par western blot

| Anticorps | Espèce | Dilution | Fournisseur |
|-----------------------------|--------|----------|---|
| Anti GFAP | Souris | 1/1000 | <i>Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA</i> |
| Anti GLAST | Lapin | 1/1000 | <i>Abcam, Cambridge, MA, USA</i> |
| Anti GS | Souris | 1/500 | <i>Millipore, Temecula, CA, USA</i> |
| Anti actine | Souris | 1/5000 | <i>Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA</i> |
| Anticorps anti-souris (HRP) | Ane | 1/60000 | <i>Jackson, West Grove, PA, USA</i> |
| Anticorps anti-lapin (HRP) | Ane | 1/30000 | <i>Jackson, West Grove, PA, USA</i> |

Figure 42: Liste des anticorps utilisés en western blot

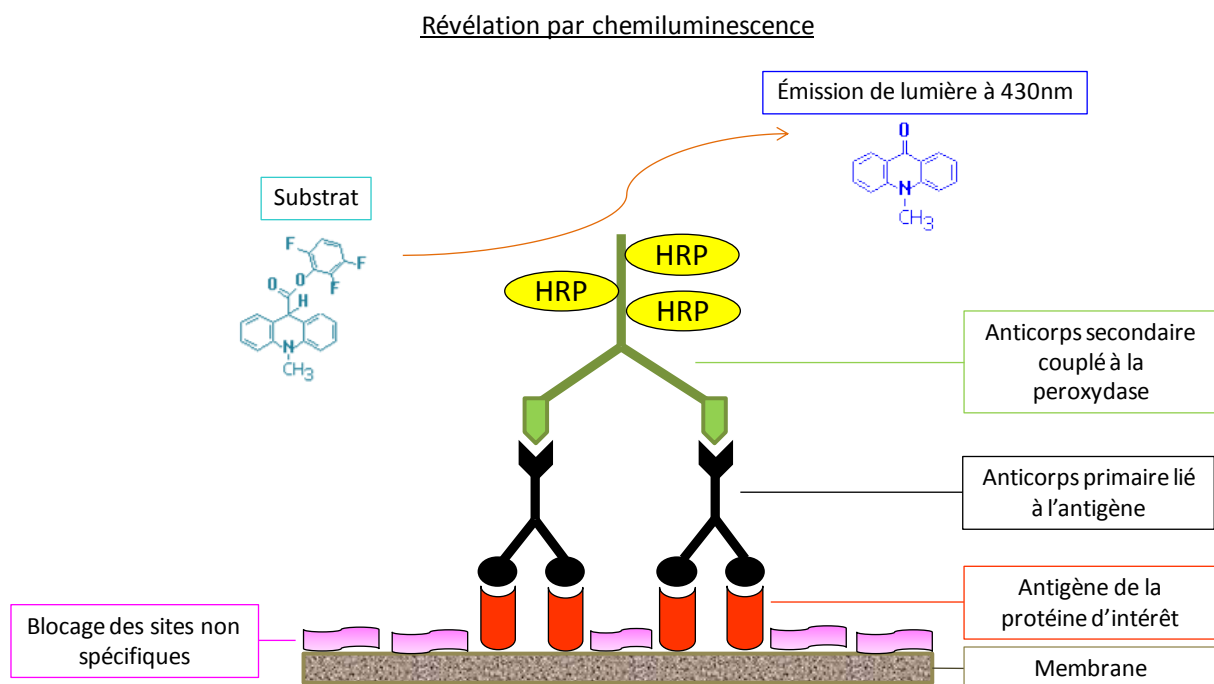


Figure 43: Illustration de la méthode de détection des protéines d'intérêt en western blot

Enfin, les membranes sont rincées à nouveau dans plusieurs bains successifs de TBST et conservées une nuit dans du TBST à 4°C avant d'être révélées. La révélation est réalisée, par chemiluminescence (Immun-Star™ WesternCTM Kit, Biorad): la peroxydase de l'anticorps secondaire réagit avec son substrat pour donner un produit luminescent (figure 43). Les membranes sont observées directement grâce à une caméra Fujifilm LAS1000 en chemiluminescence. Les bandes d'intérêts sont quantifiées grâce au logiciel d'analyse Aida Image Analyser.

2. Etude de la signalisation calcique des astrocytes glomérulaires par imagerie calcique (*Ex vivo*)

Afin d'aborder les conséquences fonctionnelles d'une telle plasticité morphologique, nous avons cherché à mettre au point des techniques d'imagerie calcique sur tranches pour étudier la signalisation calcique des astrocytes de la couche glomérulaire dans le BO chez le rat.

Les 2 sondes calciques que nous avons utilisées pour cette étude sont le FURA-2 et l'Oregon Green BAPTA-1 (OGB1), qui associent un chromophore à un chélateur de calcium organique (EGTA pour le FURA-2 et BAPTA pour l'OGB1). Ces sondes sont excitées aux longueurs d'ondes 340/380nm pour le FURA-2 et 488nm pour l'OGB1, et émettent leur fluorescence respectivement autour de 510nm et 535nm.

Dans le but d'analyser uniquement la réponse calcique astrocytaire, nous avons utilisé un colorant fluorescent, la sulforhodamineG (sulfoG), capté spécifiquement par les astrocytes, et qui devait permettre une localisation/visualisation précise de ces cellules.

a. Chargement des tranches de BO en sonde calcique et en sulforhodamine G (Figure 44)

Les tranches coronales de BO de 200-250µm d'épaisseur coupées au vibratome selon le protocole *ex vivo* décrit plus haut (paragraphe I.2.a) sont incubées dans l'obscurité, pendant 45 minutes à 37°C sous oxygénation dans de l'ACSF additionné d'une sonde calcique (FURA-2-AM ou OGB1, 5-10µM), d'acide pluronique (F-127 (0,06%)) et de sulforhodamine G (1-5µM en incubation, (25-30mM en intra-veineux)). L'acide pluronique est un détergeant non-ionique léger qui permet de faciliter le passage des sondes calciques à travers les membranes des cellules en favorisant la formation de micelles. Il permet également de limiter la fixation non-spécifique de ces sondes sur les membranes

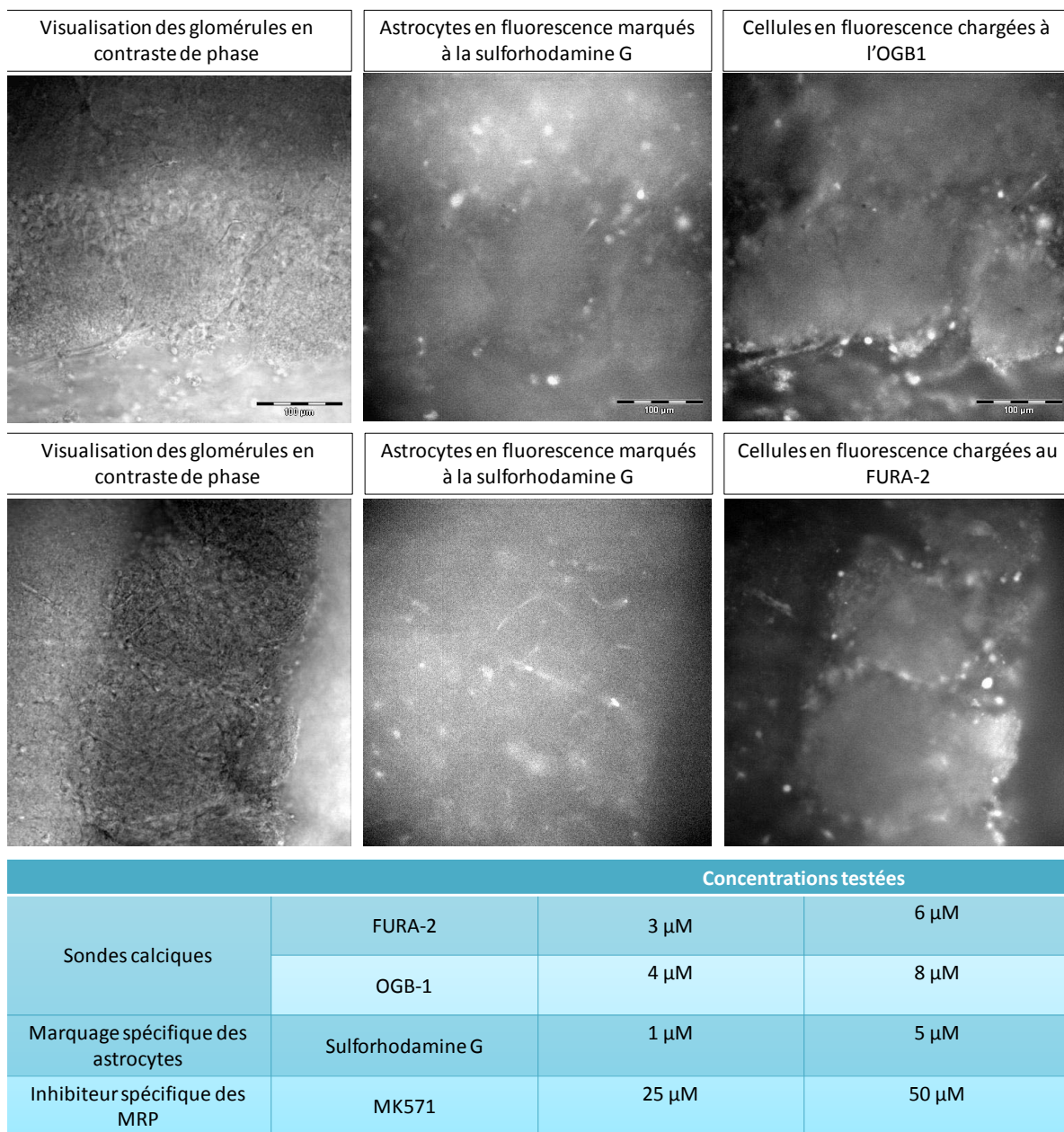


Figure 44: Chargement des tranches de bulbe olfactif en sonde calcique et en sulforhodamine G et tableau récapitulatif des concentrations testées

plasmiques des cellules. Il est utilisé à une faible concentration, non-toxique pour les cellules. La sulforhodamine G est un colorant fluorescent dans le rouge ($\lambda_{\text{émission}}$: 586nm) capté spécifiquement par les astrocytes dans le système vasculaire ou par incubation des tissus. Son utilisation permet d'analyser spécifiquement les réponses calciques des astrocytes (Appaix et al., 2012; Nimmerjahn and Helmchen, 2012; Nimmerjahn et al., 2004).

Pour certains tests d'imagerie calcique, les tranches de BO ont également été incubées en présence d'un inhibiteur des transporteurs MRP (*Multidrug Resistance associated Protein*), le MK571 (25-50 μ M), en même temps que les sondes calciques et la sulforhodamine G. Les transporteurs MRP sont des protéines transmembranaires de la famille des transporteurs ABC (à activité ATPasique) qui permettent la fuite, hors des cellules, de molécule lipophile anionique. Ces transporteurs ont également été caractérisés pour avoir un rôle dans la détoxification cellulaire de nombreux composés cytotoxiques endogènes ou exogènes, s'opposant notamment à la pénétration dans les cellules de certaines sondes (comme ce pourrait être le cas pour la sulforhodamine G) (Manzini and Schild, 2003; Molinas et al., 2012).

Plusieurs concentrations différentes des sondes calciques, de la sulforhodamine G et du MK571 ont été testées à partir de concentrations de référence déterminées au préalable au laboratoire ou en fonction des données de la littérature.

Les concentrations testées sont récapitulées dans le tableau de la figure 44.

b. Montage expérimental et application d'agent pharmacologique

Après une période de récupération des tissus, d'au moins 30-60 minutes dans l'ACSF oxygéné, les tranches de BO sont transférées dans une chambre d'enregistrement en plexiglas, perfusée en continu par gravité par un courant laminaire avec de l'ACSF oxygéné à un débit de 2,5 à 3 ml/min.

Deux agents pharmacologiques différents ont été utilisés comme agoniste stimulant l'augmentation des concentrations de calcium intracellulaire des cellules : le tACPD à 20 μ M (agoniste spécifique des récepteurs métabotropiques du groupe I au glutamate (mGluRs)) et l'ATP à 10⁻⁴M (utilisé comme contrôle positif dans cette étude). Ces agents pharmacologiques sont dilués dans de l'ACSF oxygéné et sont appliqués via le système de perfusion durant l'enregistrement. Les concentrations utilisées pour ces agents pharmacologiques ont été testées et déterminées au préalable au laboratoire.

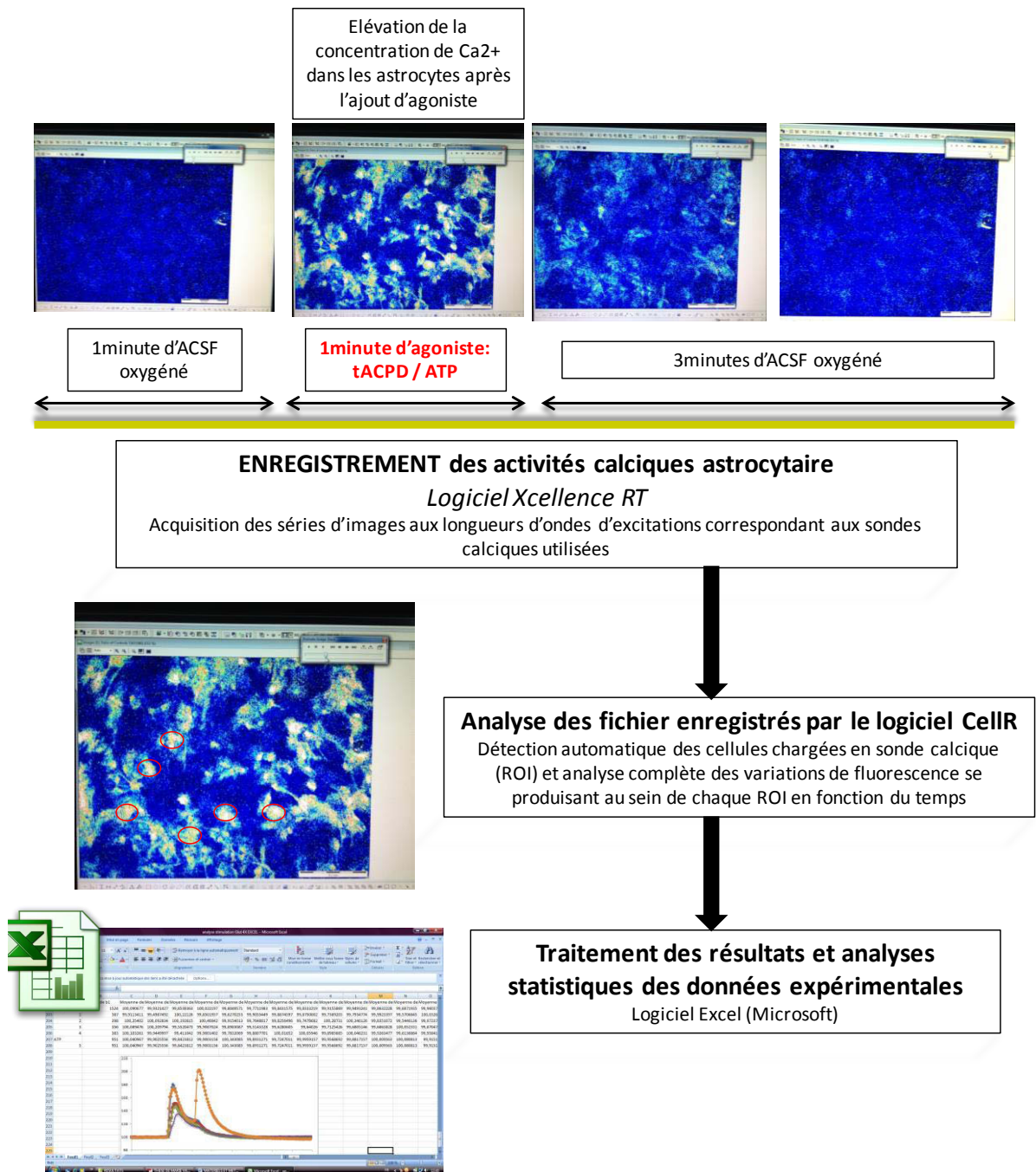


Figure 45: Acquisition des signaux calciques et traitements des données expérimentales

Le protocole d'enregistrement des activités calciques des astrocytes est le suivant :

- 1 minute de perfusion d'ACSF contrôle
- 1 minute de perfusion d'ACSF contenant l'agoniste (tACPD ou ATP)
- 3 minutes de lavage en ACSF contrôle

Ce protocole est représenté sur la figure 45.

Le temps de lavage entre deux stimulations sur une même coupe est de 10 minutes.

c. Acquisition des signaux calciques et traitements des données expérimentales

Les mesures d'imagerie calcique par fluorescence ont été effectués sur un microscope droit (Olympus BX51WI) équipé d'un objectif à immersion à eau 20x-40x-80x (XLUMPLFL20XW, NA, 0.95 et changeur de grossissement intermédiaire), d'un système de visualisation par contraste interdifférentiel et d'une illumination/caméra vidéo infrarouge. Les acquisitions d'images ont été réalisées au moyen d'une station d'imagerie en épifluorescence (CellR) pilotée par le logiciel XcellenceRT (Olympus, Soft Imaging Solutions - OSIS) et d'une caméra refroidie de type EM-CCD C9100-13 (Hamamatsu Photonics. Pour nos expériences, l'acquisition des séries d'images se faisait à une fréquence de 1 Hz et avec une durée d'acquisition comprise entre 50 et 200 ms par image, sur des durées d'enregistrement de 5 minutes (300 images). Les fichiers enregistrés étaient ensuite analysés grâce au logiciel *XCellence RT* au sein des ROIs (Regions Of Interest) correspondant et les résultats exportés vers un logiciel Excel (Microsoft) (Figure 45).

Les variations de fluorescence étaient ensuite normalisées par rapport à la moyenne de fluorescence à l'état basal (30s précédant la stimulation) et exprimés en $\% \Delta F/F = ((F - F_{\text{baseline}})/F_{\text{baseline}}) \times 100$. Une cellule était considérée comme répondante lorsque la fluorescence normalisée dépassait 105% du niveau de base en réponse à l'application d'un stimulus.

V. Analyses statistiques

Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel \mathbb{R} . Tous les résultats sont représentés par leur moyenne et l'erreur standard à la moyenne (SEM).

Les données ont été analysées par des tests de permutation par comparaisons de 2 ou plus de 2 échantillons indépendants, pouvant utiliser jusqu'à 5000 permutations par test, avec une correction d'erreur de première espèce par la méthode de Bonferroni dans le cas des comparaisons multiples.

Cette méthode est une alternative moderne et puissante aux comparaisons par tests reposant sur des hypothèses de distribution ou les tests non-paramétriques. Elle est particulièrement adaptée pour l'analyse statistique de plusieurs petits ou très petits échantillons indépendants ($n < 30$). De plus, la correction d'erreur réalisée évalue la probabilité d'obtenir au moins un faux positif parmi l'ensemble des hypothèses testées.

Les tests de permutations utilisés sont ceux des bibliothèques « Coin » (\leq deux échantillons comparés) et « RVAideMemoire » (multiples échantillons indépendants) du logiciel \mathbb{R} .

Pour chacun des tests, le seuil de significativité est fixé à 5 % d'erreur ($p < 0,05$).

RESULTATS

Résultats

L'objectif de ce projet était de tester l'hypothèse selon laquelle les astrocytes glomérulaires du BO sont impliqués dans la détection de l'état métabolique de l'organisme par le système olfactif. Pour cela nous avons étudié, dans un premier temps, les variations du déploiement astrocytaire au sein des glomérules du BO en fonction de l'état nutritionnel chez le rat, puis dans un second temps, les pistes mécanistiques potentiellement impliquées dans les modifications morphologiques observées. Enfin, nous avons entrepris la mise au point des expérimentations pour l'étude des modifications fonctionnelles du réseau astrocytaire (signalisation calcique).

I. Caractérisation du modèle de jeûne : Influence de la durée du jeûne sur la physiologie générale

Dans notre modèle d'étude, l'état nutritionnel est modulé par des mises à jeun. A partir des données de la littérature, trois durées de jeûne, couramment utilisées, ont été sélectionnées : 17h, 24h et 48h. Notre objectif était de caractériser l'impact du jeûne sur la physiologie générale des animaux, afin de pouvoir relier les modifications du déploiement astrocytaire au degré de sévérité du jeûne.

1. Effet du jeûne sur le poids corporel (Figure 46)

Les rats nourris *ad libitum*, âgés de 5 semaines, ont un poids moyen de 176,41 g et présentent un gain de poids de 8,9% pendant les 48h séparant les 2 pesées. En revanche les animaux privés de nourriture pendant 17h, 24h et 48h, présentent une perte pondérale de 6,4% ; 6.8% et 17,9% respectivement ($p=0.0024$, vs rats nourris). La perte de poids est plus importante chez les animaux en situation de jeûne prolongé de 48h ($p=0.0024$) par rapport à ceux de 17h et 24h.

2. Effet du jeûne sur la glycémie (Figure 47)

La glycémie moyenne des rats nourris est de 137,8 mg/dL. La glycémie est significativement plus faible chez les rats à jeun, par rapport aux rats nourris, quelle que soit la durée de jeûne et sans différence significative entre les différentes durées de jeûne, avec une glycémie moyenne de 94,3 mg/dL ($p=0.01$ vs nourris); 93.2 mg/dL ($p=0.02$ vs nourris) et 81.83 mg/dL ($p=0.01$ vs nourris) chez les animaux à jeun pendant 17h, 24h et 48h respectivement.

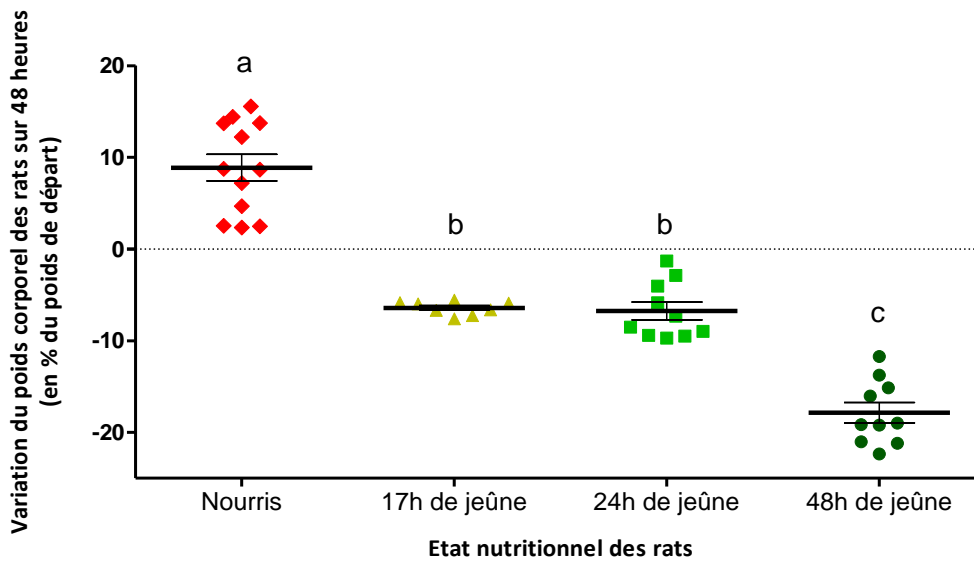


Figure 46: Effet du jeûne sur le poids corporel des rats

Variation de poids au cours des dernières 48h avant la fin de la période de jeûne (poids au moment du sacrifice – poids à t=-48h). Les données représentent la moyenne \pm S.E.M. de n=10 à 12 rats par groupe et sont comparées selon un test par permutation (5000 permutations - Logiciel R) avec correction de "Bonferroni": a**≠**b**≠**c p<0.01

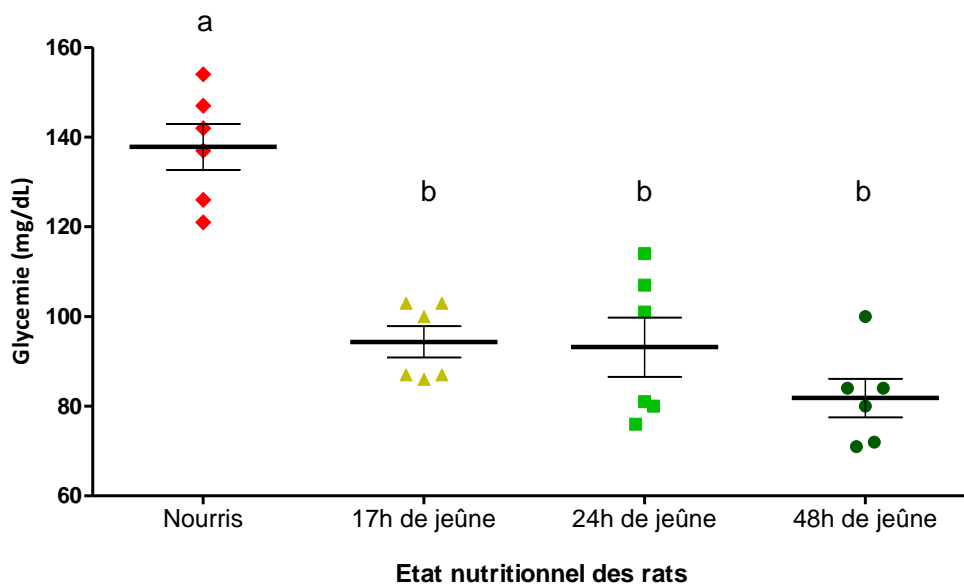


Figure 47: Effet du jeûne sur la glycémie des rats

La glycémie est mesurée à l'issue de la période de jeûne. Les données représentent la moyenne \pm S.E.M. de n= 6 rats par groupe et sont comparées selon un test par permutation (5000 permutations - Logiciel R) avec correction de "Bonferroni": a**≠**b p<0.05

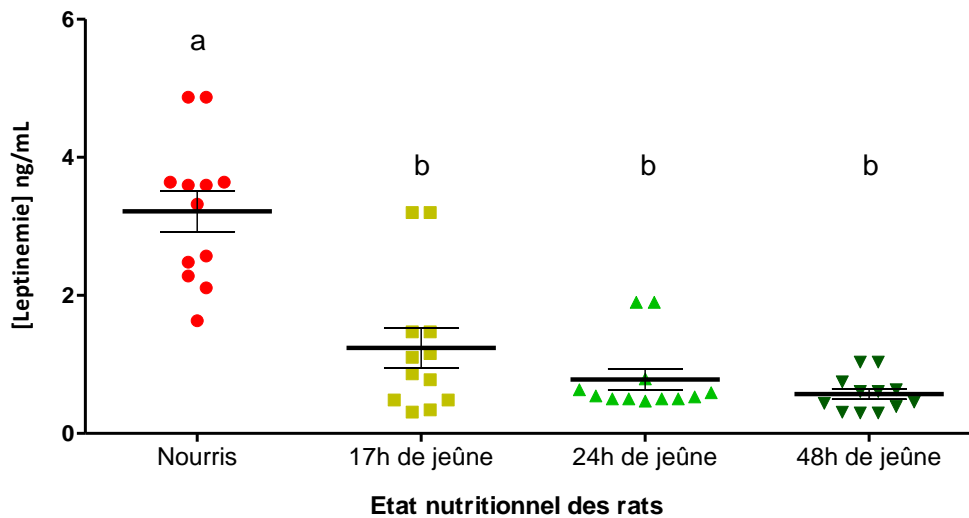


Figure 48: Effet du jeûne sur la leptinémie des rats

La leptinémie est mesurée à l'issue de la période de jeûne.

Les données sont représentées par la moyenne \pm S.E.M. de n=12 rats par groupe et comparées selon un test par permutation (5000 permutations - Logiciel R) avec correction de "Bonferroni": $a \neq b$ $p < 0.002$

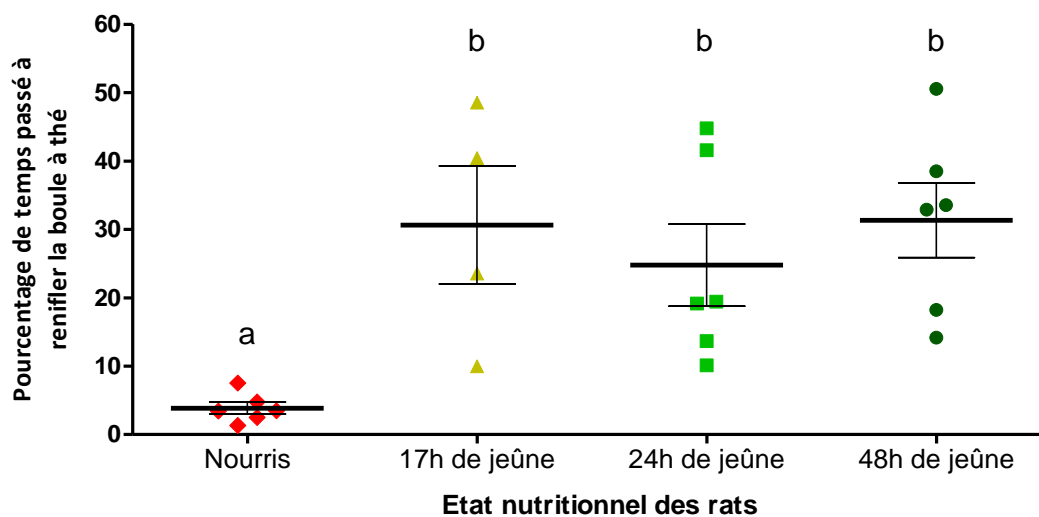


Figure 49: Effet du jeûne sur le comportement de recherche alimentaire

La motivation des rats pour la recherche de nourriture est mesurée par le temps passé à flairer une boule à thé contenant des croquettes, exprimé en pourcentage du temps total (15min). Les données sont représentées par la moyenne \pm S.E.M. de n= 4 à 6 rats par groupe et comparées selon un test par permutation (5000 permutations - Logiciel R) avec une correction de "Bonferroni": $a \neq b$ $p < 0.05$

3. Effet du jeûne sur la leptinémie (Figure 48)

La leptinémie moyenne est de 3,21 ng/dl chez les animaux nourris *ad libitum*. Elle est significativement plus faible ($p=0.002$) chez les rats à jeun 17h (1,23 ng/dl), 24h (0.78 ng/dl) et 48h (0,57 ng/dl) sans différence significative entre les différentes durées de jeûne.

4. Effet du jeûne sur le comportement de recherche alimentaire (Figure 49)

La mesure du temps de reniflage d'une boule à thé contenant des croquettes, cachée dans la sciure, reflète la motivation des rats à chercher la nourriture.

Le temps de reniflage observé est augmenté chez les rats à jeun, par rapport aux rats nourris ($p<0.05$), quelle que soit la durée de jeûne et sans différence significative entre les différents temps de jeûne. Les rats nourris *ad libitum* ont passé 3,8 % du temps à renifler la boule à thé, alors que les animaux à jeun 17h, 24h et 48h ont passé respectivement 30.64 %, 24.79 % et 31,3 % du temps à la renifler. Une fois la boule à thé trouvée dans la sciure, les rats à jeun restent à renifler ou à manipuler la boule à thé sur la totalité du temps de l'expérimentation (15 minutes), alors que les rats nourris s'en désintéressent rapidement. Dès 17h de jeûne, les rats ont une motivation plus forte pour la recherche de nourriture comparativement aux rats nourris.

Le temps nécessaire aux rats pour trouver la boule à thé sous la sciure reflète leur acuité olfactive. Les résultats (non présentés ici) n'ont pas montré de différence liée à l'état nutritionnel des rats. Cependant, ce test peut être influencé par d'autres facteurs tels que le stress ou la forme physique. En effet, les animaux à jeun, surtout pour les jeûnes prolongés de 24h et 48h, sont moins vifs et plus lents à se déplacer, comparativement aux rats nourris ou à jeun 17h, ce qui impacte probablement leur rapidité à trouver la boule à thé. De plus, les animaux nourris ont une forte tendance au jeu et explorent davantage leur environnement que les rats à jeun qui sont beaucoup plus concentrés sur la recherche de nourriture.

Au vu de l'ensemble des résultats, nous observons que les paramètres physiologiques sont significativement différents dès 17h de jeûne, comparativement aux animaux nourris *ad libitum*. Le jeûne de 17h étant moins sévère que ceux de 24h et 48h, nous avons donc choisi d'étudier uniquement l'effet du jeûne de 17h sur l'expression des ARNm des peptides hypothalamiques impliqués dans la régulation de la prise alimentaire.

5. Effet d'un jeûne de 17h sur l'expression des ARNm des peptides hypothalamiques impliqués dans la régulation de la prise alimentaire

Les neurones hypothalamiques modulent la prise alimentaire via l'activation des voies orexigènes et anorexigènes impliquant de nombreux facteurs. Sept marqueurs ont été étudiés : le NPY et l'AgRP (peptides orexigènes); POMC, CART et CRH (peptides anorexigènes) ainsi que les récepteurs Y2R et MC4R (récepteurs de la voie anorexigène). Par souci de clarté, seuls les résultats des gènes qui présentent une différence significative d'expression en fonction du statut nutritionnel du rats (Nourris/à jeun) sont représentés (figures 50 et 51). Les résultats de l'ensemble des gènes étudiés dans nos différents modèles sont répertoriés dans la figure 52

Comparativement aux rats nourris *ad libitum*, on observe chez les rats à jeun 17h une augmentation de 56% de l'expression des ARNm du NPY ($p=0.018$, figure 50) et de 36% de l'expression des ARNm du CRH ($p=0.05$, figure 51).

Un jeûne de 17h active la voie orexigène de l'hypothalamus en augmentant l'expression des ARNm du NPY, très fortement impliqué dans l'initiation de la prise alimentaire, sans modifier l'expression génique de l'AgRP, POMC, CART, Y2R et MC4R. De façon étonnante ce temps de jeûne active également, comparativement aux animaux nourris, l'expression du facteur anorexigène CRH.

Résumé : Influence de la durée du jeûne sur la physiologie générale

Dès 17h de jeûne, on observe une perte de poids, une diminution de la glycémie et de la leptinémie, ainsi qu'une augmentation de la motivation à rechercher des aliments, comparativement aux rats nourris. Ces données sont en accords avec la littérature pour ces durées de jeûne.

Pour l'ensemble des paramètres physiologique analysés, nous n'observons pas de différence entre les jeûnes de 17h, 24h et 48h sauf pour le poids corporel. Les rats à jeun depuis 17h et 24h ont une perte de poids d'environ 10% alors que les rats à jeun depuis 48h présentent une perte de poids d'environ 20% considérée comme critique et stressante pour l'animal (Dietze et al., 2016a).

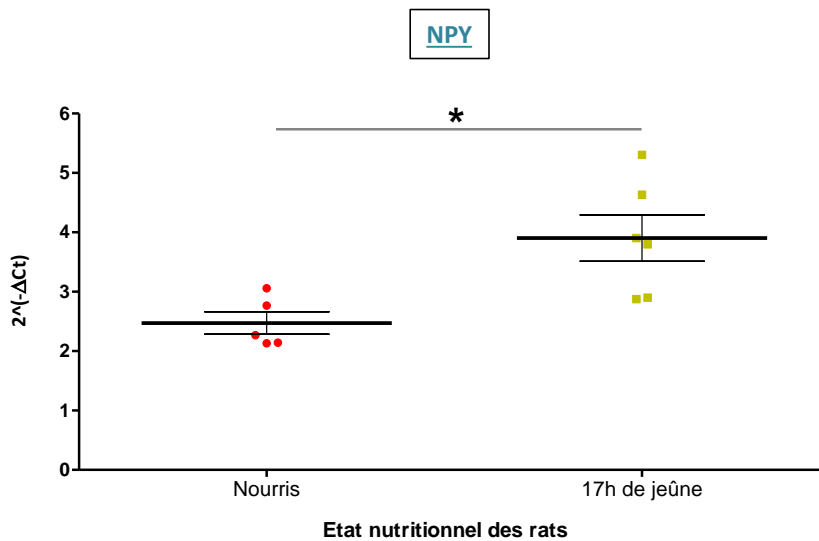


Figure 50: Effet d'un jeûne de 17h sur l'expression des ARNm du NPY (peptide orexigène) dans l'hypothalamus

L'expression des ARNm du NPY a été analysée par PCR quantitative en temps réel sur l'hypothalamus prélevé au sacrifice des rats après 17h de jeûne. Le résultat est exprimé en valeur absolue ($2^{-\Delta CT}$) avec une normalisation par le gène de référence 18S.

Les données sont représentées par la moyenne \pm S.E.M. de $n= 5$ à 6 rats par groupe et comparées par un test de permutation (5000 permutations - Logiciel R) avec une correction de "Bonferroni": * $p \leq 0.05$

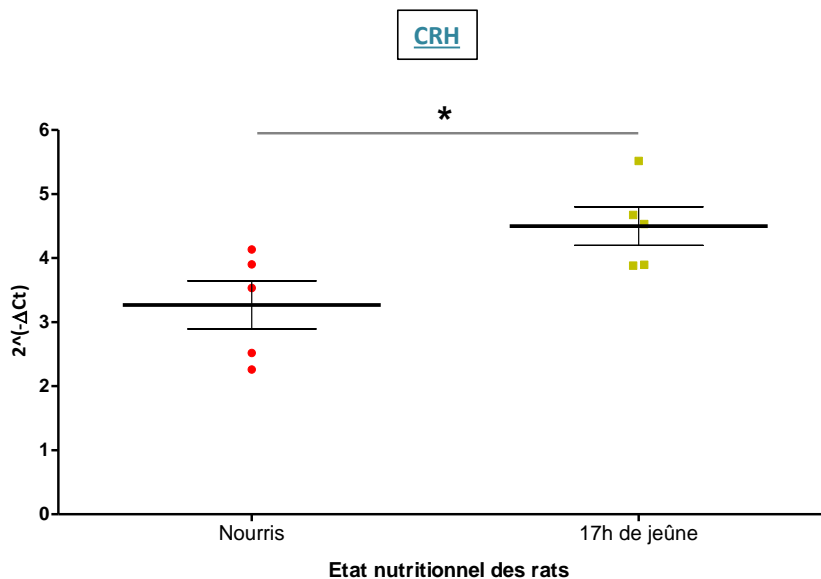


Figure 51: Effet d'un jeûne de 17h sur l'expression des ARNm du CRH (peptide anorexigène) dans l'hypothalamus

L'expression des ARNm du CRH a été analysée par PCR quantitative en temps réel sur l'hypothalamus prélevé au sacrifice des rats après 17h de jeûne. Le résultat est exprimé en valeur absolue ($2^{-\Delta CT}$) avec une normalisation par le gène de référence 18S.

Les données sont représentées par la moyenne \pm S.E.M. de $n= 5$ rats par groupe, et comparées par un test de permutation (5000 permutations - Logiciel R) avec une correction de "Bonferroni": * $p \leq 0.05$

| ARNm | Rôle physiologique dans la prise alimentaire | d | | | | |
|------|--|--------------|-------------------|------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|
| | | Rats nourris | Rats à jeun (17h) | Rats nourris + i.p. ghreline | Rats à jeun (17h) + i.p. PYY3-36 | Rats à jeun (17h) + i.p. glucose |
| NPY | Orexigenic | 2,5 ± 0,2 | 3,9 ± 0,4 (a) | 3,3 ± 0,2 (b) | 3,7 ± 0,4 | 3,4 ± 0,3 |
| AgRP | Orexigenic | 3,7 ± 0,3 | 4,0 ± 0,3 | 4,7 ± 0,4 | 4,0 ± 0,4 | 3,8 ± 0,2 |
| POMC | Anorexigenic | 3,7 ± 0,4 | 4,3 ± 0,6 | 4,5 ± 0,6 | 3,6 ± 0,5 | 3,5 ± 0,5 |
| CART | Anorexigenic | 3,8 ± 0,3 | 4,1 ± 0,2 | 4,2 ± 0,5 | 3,8 ± 0,5 | 3,7 ± 0,4 |
| Y2R | Anorexigenic | 1,5 ± 0,1 | 1,6 ± 0,1 | 1,8 ± 0,1 | 1,5 ± 0,1 | 1,5 ± 0,1 |
| MC4R | Anorexigenic | 5,0 ± 0,5 | 5,8 ± 0,2 | 6,6 ± 0,4 (b) | 4,9 ± 0,5 | 6,1 ± 0,5 |
| CRH | Anorexigenic | 3,3 ± 0,4 | 4,5 ± 0,3 (a) | 4,5 ± 0,3 (b) | 3,3 ± 0,5 | 3,7 ± 0,3 |

Figure 52: Effet d'un jeûne de 17h sur l'expression des ARNm des peptides hypothalamiques impliqués dans la régulation de la prise alimentaire

L'expression des ARNm des peptides a été analysée par PCR quantitative en temps réel sur l'hypothalamus prélevé au sacrifice des rats après 17h de jeûne. Les résultats sont exprimés en valeur absolue ($2^{-\Delta CT}$) avec une normalisation avec le gène de référence 18S.

Les données sont représentées par la moyenne ± S.E.M. de n= 5 à 6 rats par groupe et comparées par un test de permutation (5000 permutations - Logiciel R) avec une correction de "Bonferroni": * p<0.05

II. Effet du jeûne sur le déploiement des astrocytes du bulbe olfactif

1. Etude du recouvrement astrocytaire au sein des glomérules bulbaires en fonction de l'état nutritionnel

Le marquage des noyaux réalisé sur des coupes horizontales de BO permet de distinguer les différentes couches cellulaires caractéristiques du BO, avec en particulier la couche glomérulaire. Les glomérules sont délimités par des noyaux en périphérie. L'analyse quantitative et qualitative du déploiement astrocytaire au sein de chaque glomérule est réalisée grâce au marquage de la GFAP (protéine acide des glio-filaments).

a. Analyse quantitative du déploiement astrocytaire au sein des glomérules du bulbe olfactif en fonction de l'état nutritionnel

Le BO est une structure hétérogène, régionalisée selon un axe dorso-ventral, impliquant probablement des régulations propres à chaque zone. Nous avons quantifié le marquage de la GFAP par glomérule, dans trois régions distinctes: dorsale, médiane et ventrale. La comparaison entre les rats nourris et à jeun (17h, 24h et 48h) a été réalisée sur des coupes équivalentes dans leur positionnement dorso-ventral dans le BO. Environ 370 glomérules ont été analysés par rats, soit en moyenne 123 glomérules par région et par rat. Les résultats sont présentés en pourcentage de l'aire du marquage GFAP sur l'aire totale de chaque glomérule (Figure 53 et 54).

Comparativement aux animaux nourris *ad libitum*, un jeûne de 17h entraîne une augmentation de 43.7% du marquage de la GFAP dans chaque glomérule quelle que soit la localisation dans le BO ($p=0.0048$ au niveau dorsal et ventral ; $p=0.029$ au niveau médian). Le pourcentage de GFAP au sein des glomérules et dans l'ensemble des régions du BO est, en moyenne, de 28.33% chez les animaux nourris et de 40.72% chez les animaux à jeun 17h. Après 24h de jeûne on observe également une augmentation du marquage GFAP/glomérule, comparativement aux rats nourris, mais uniquement au niveau des régions médianes (+ 34.6%, $p=0.022$) et ventrales (+ 47.9%, $p=0.0048$). En revanche pour un jeûne plus prolongé de 48h nous n'observons plus de différence significative du marquage GFAP/glomérule, et cela dans l'ensemble des régions du BO.

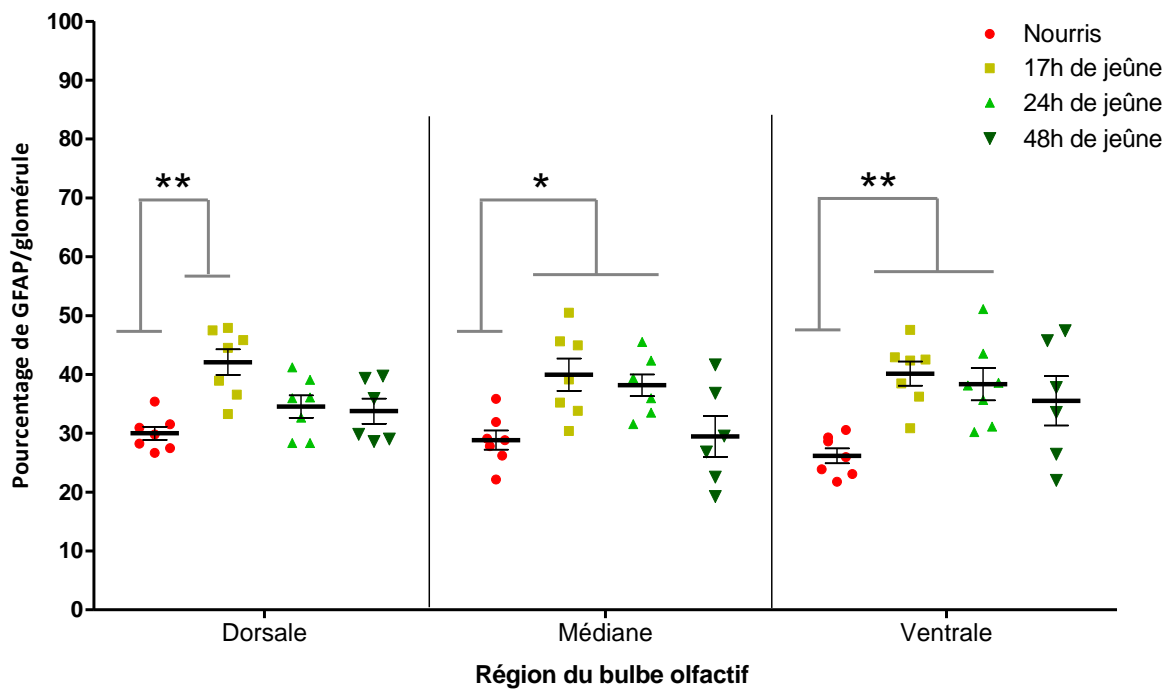


Figure 53: Effet du jeûne sur le déploiement astrocytaire dans les glomérules du BO

L'aire marquée pour la GFAP, analysée sur ImageJ et exprimée en pourcentage de l'aire totale de chaque glomérule, mesure le niveau du déploiement astrocytaire dans les glomérules bulbaires. Les marquages immuno-histochimiques ont été réalisés sur des coupes de bulbes olfactifs prélevés au sacrifice des rats à l'issue des différentes durées de jeûne. Les données représentent la moyenne \pm S.E.M. des mesures réalisées sur 40 à 60 glomérules/coupe, sur 2 à 3 coupes/région du BO/rat, pour n=7 rats par groupe. Elles sont comparées par un test de permutation (5000 permutations - Logiciel R) avec une correction de "Bonferroni": * $p \leq 0.05$ et ** $p < 0.01$.

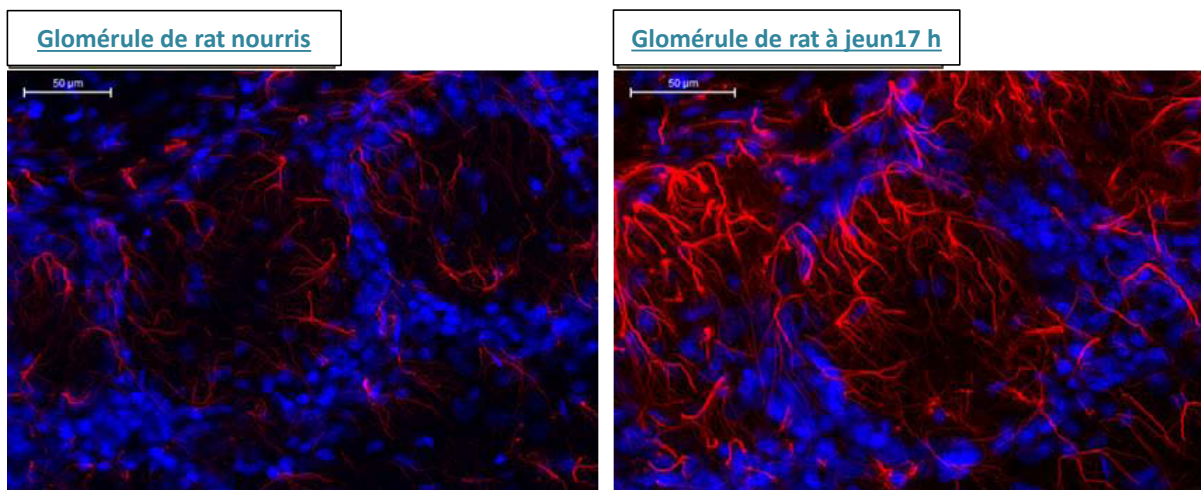


Figure 54: Comparaison du déploiement astrocytaire dans les glomérules du BO en fonction de l'état nutritionnel des rats

Marquage immunohistochimique des prolongements astrocytaires marqués par la GFAP (rouge) et des noyaux péri-glomérulaires marqués par du Hoechst (bleu). Les photos ont été réalisées à partir du logiciel panoramique viewer à l'objectif 40X, après immunohistochimie sur les bulbes olfactifs prélevés au sacrifice des rats, nourris ou après 17h de jeûne.

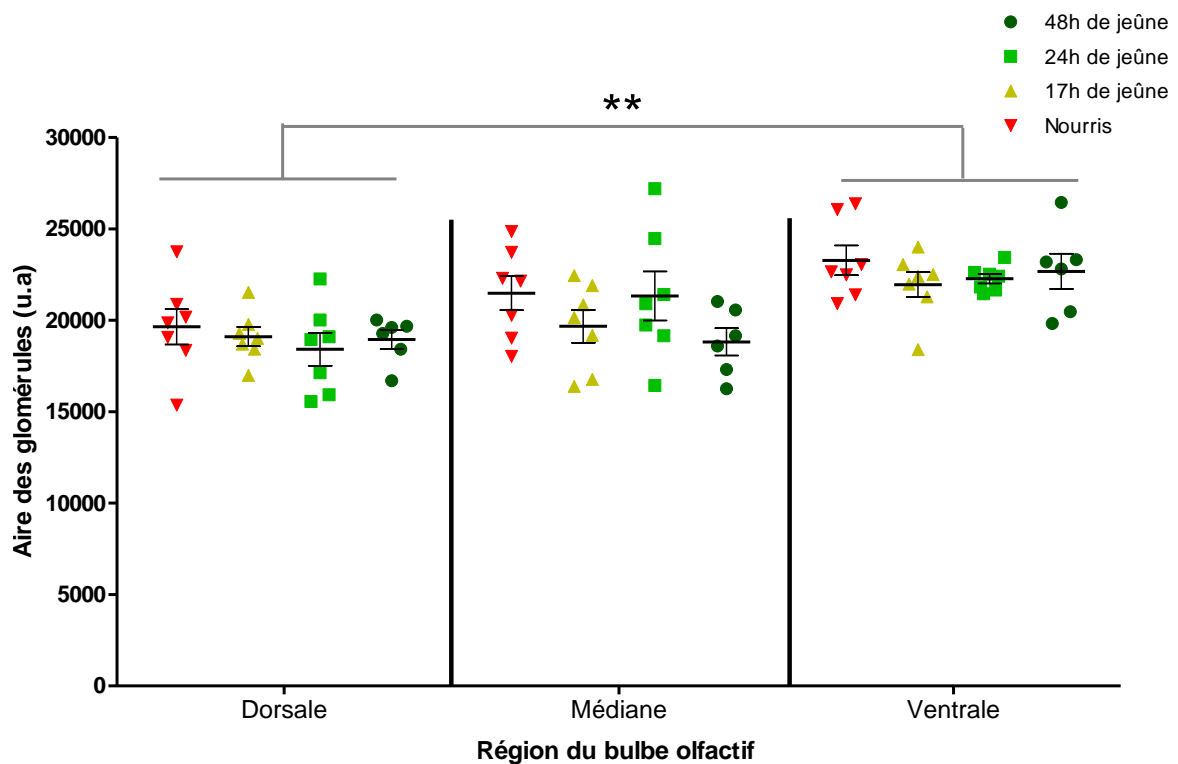


Figure 55: Vérification de la surface totale des glomérules du BO

L'aire de chaque glomérule a été mesurée à l'aide du logiciel ImageJ après immunohistochimie sur les bulbes olfactifs prélevés au sacrifice des rats après un jeûne de 17, 24 ou 48h. Les résultats sont exprimés en unité arbitraire.

Les données représentent la moyenne \pm S.E.M. des mesures réalisées sur 40 à 60 glomérules/coupe, sur 2 à 3 coupes/région du BO/rat, pour n=7 rats par groupe, et comparées par un test de permutation (5000 permutations - Logiciel R) avec une correction de "Bonferroni": **p<0,01.

La taille des glomérules (surface totale) est très variable ; elle peut dépendre du niveau de la coupe dans la sphère glomérulaire ou de la taille globale du glomérule. Nous avons quantifié et comparé, entre les rats nourris et les rats à jeun (17h, 24h et 48h), l'aire de chaque glomérule. Les résultats sont présentés sur la figure 55.

Les glomérules ventraux sont significativement plus grands que les glomérules dorsaux et ceci quel que soit l'état nutritionnel des rats ($p < 0.01$). La taille des glomérules médians n'est pas différente des glomérules dorsaux et ventraux, soulignant une augmentation croissante de la taille des glomérules au sein de l'axe dorso-ventral du BO. Enfin, nous n'observons pas d'effet significatif du jeûne sur la taille des glomérules du BO et cela quelle que soit la durée de jeûne.

Ces résultats mettent en évidence qu'un jeûne de 17h entraîne une augmentation significative du déploiement astrocytaire au sein des glomérules dans l'ensemble des régions du BO. Cette augmentation est également observée après 24h de jeûne, de façon plus localisée, dans les régions médiane et ventrale, mais annulée pour un temps de jeûne beaucoup plus long de 48h. Nous avons donc centré la suite de notre étude sur le jeûne de 17h.

b. Analyse qualitative du réseau astrocytaire au sein des glomérules du BO en fonction de l'état nutritionnel

Compartimentation et orientation des astrocytes dans les glomérules

L'ensemble des photos analysées (exemple figure 56) montrent une organisation particulière des prolongements astrocytaires dans les glomérules du BO.

Les corps astrocytaires sont situés en périphérie de chaque glomérule, et envoient leurs prolongements vers l'intérieur du glomérule. A l'échelle du BO on observe une orientation centripète des prolongements astrocytaires dans les glomérules qui semblent ainsi accompagner les arrivées axonales et dendritiques des neurones glomérulaires.

Etude du réseau astrocytaire au sein des glomérules en fonction de l'état nutritionnel

Chez les animaux à jeun 17h, les prolongements astrocytaires semblent se déployer plus loin vers le centre des glomérules et paraissent former un réseau plus complexe que lorsque les rats sont nourris *ad libitum* (Figure 54).

Afin de mieux caractériser l'augmentation du déploiement astrocytaire en fonction de l'état nutritionnel, nous avons analysé l'architecture du réseau astrocytaire grâce au plugin « skeleton » du logiciel *imageJ* chez des rats nourris *ad libitum* comparativement aux rats à jeun 17h. Ce plugin permet d'analyser le niveau de réticulation du réseau astrocytaire à partir du marquage de la GFAP.

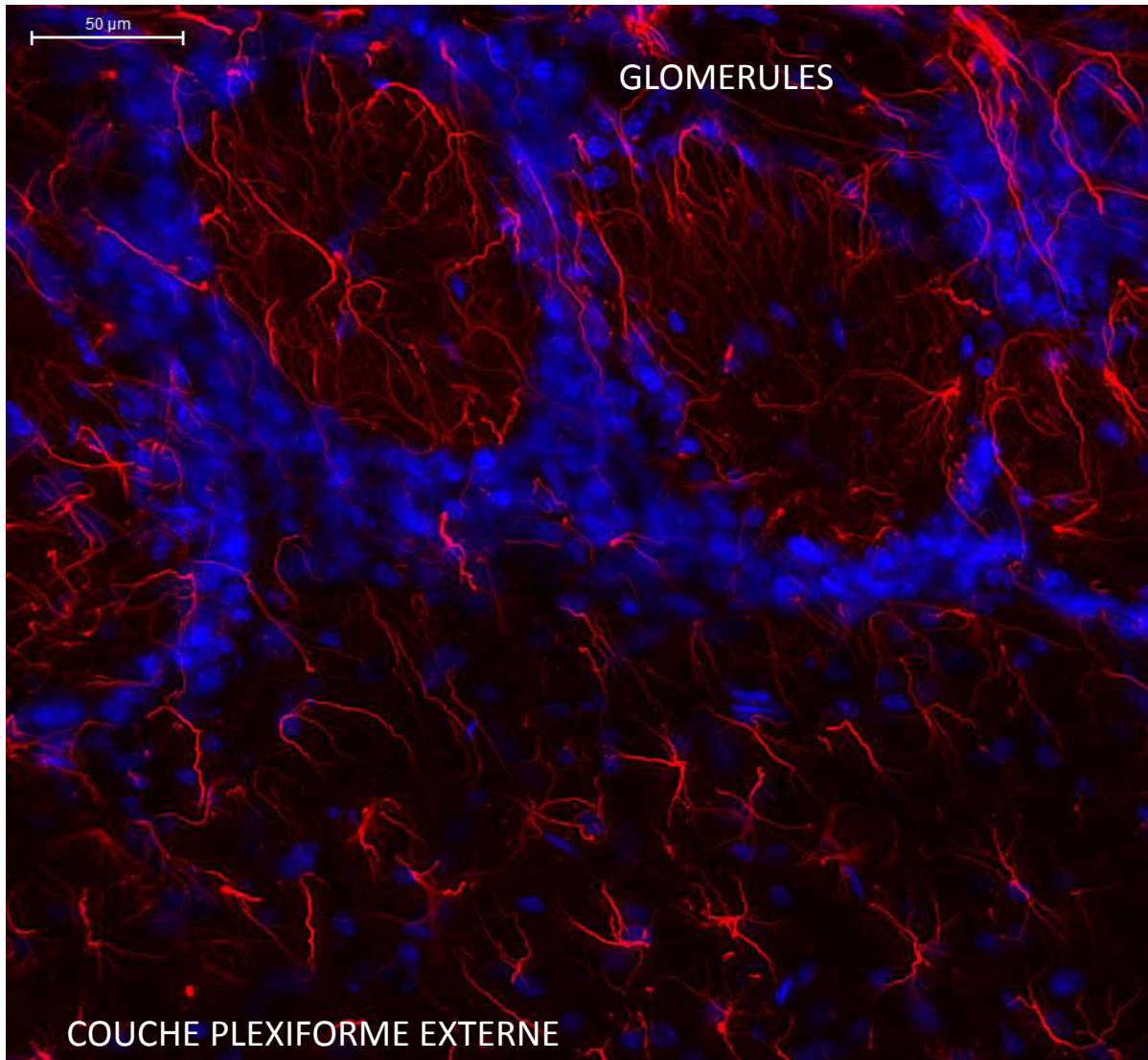


Figure 56: Compartimentation et orientation des astrocytes dans les glomérules de BO de rat

Marquage immunohistochimique des prolongements astrocytaires marqués par la GFAP (rouge) et des noyaux entourant les glomérules marqués par du Hoechst (bleu). Les photos ont été réalisées à partir du logiciel panoramatic viewer à l'objectif 40X après immunohistochimie sur les bulbes olfactifs prélevés au sacrifice des rats (ici un rat nourri).

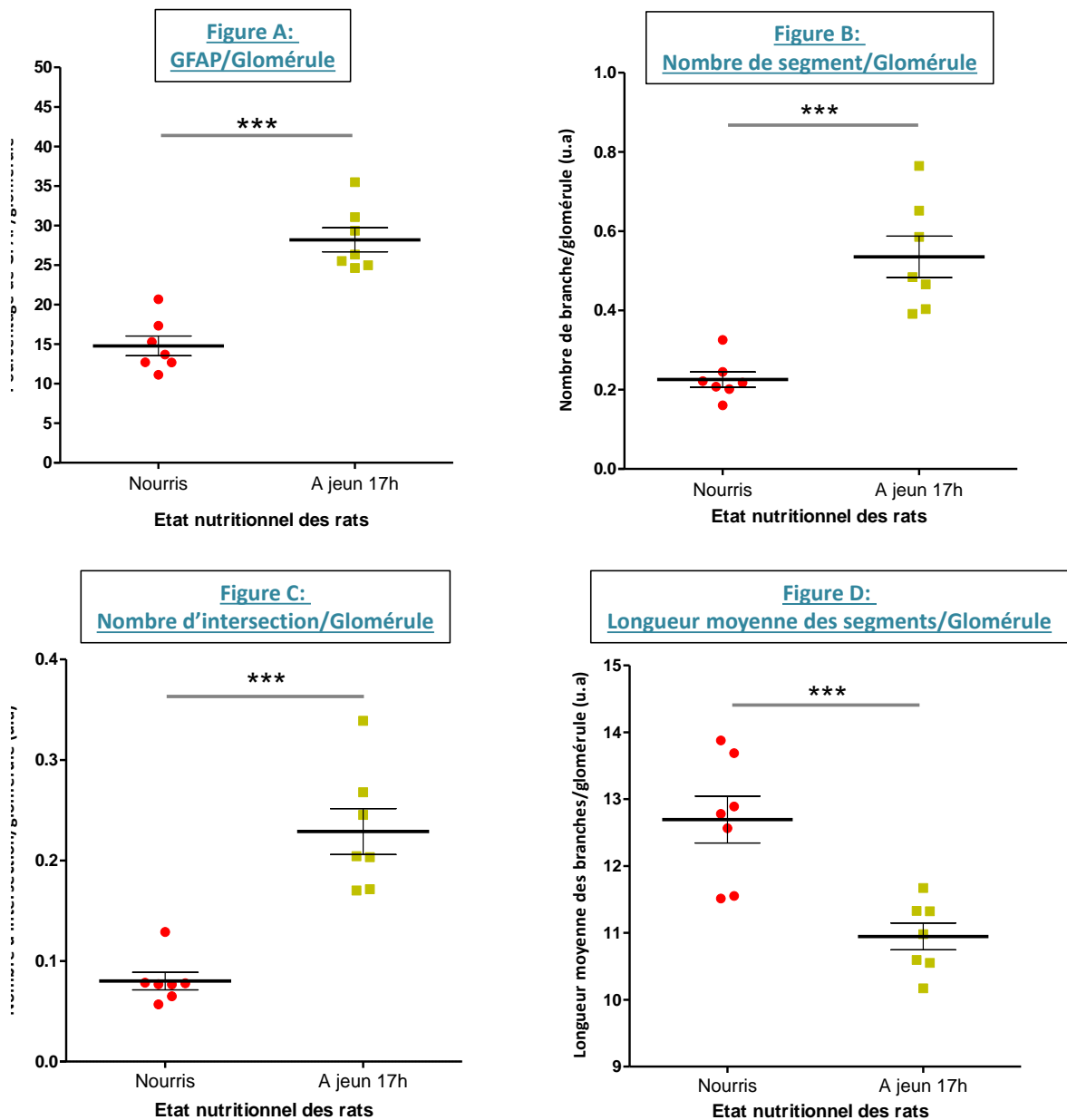


Figure 57: Effet du jeûne de 17h sur l'architecture du réseau astrocytaire des glomérules de BO de rat

L'architecture du réseau astrocytaire des glomérules est analysée à l'aide du plugin « skeleton » du logiciel *imageJ*. Ce plugin permet d'analyser le niveau de réticulation du réseau astrocytaire à partir du marquage de la GFAP (voir Matériel et Méthodes). Les 3 paramètres analysés pour chaque glomérule sont : le nombre de segments (B) et d'intersections (C) (rapporté à l'aire de chaque glomérule) et la longueur moyenne des segments (D). Les résultats sont exprimés en unité arbitraire (u.a).

GFAP/Glomérule: Le déploiement astrocytaire (A) est mesuré en pourcentage de l'aire du marquage de la GFAP sur l'aire totale de chaque glomérule.

Les données représentent la moyenne \pm S.E.M. des mesures réalisées sur 2 à 3 glomérules/coupe sur 1 coupe/rat pour $n=7$ rats par groupe, et comparées par un test de permutation (5000 permutations - Logiciel R) avec une correction de « Bonferroni »: *** $p<0,001$.

Les 3 paramètres analysés par glomérule sont : le nombre de segments, d'intersections (rapporté à l'aire de chaque glomérule), et la longueur moyenne des segments. Plus le réseau est dense plus le nombre de segments et d'intersections est élevé et moins la longueur des segments est grande. Les résultats des analyses skeleton sont présentés sur la figure 57.

Pour ces analyses, nous avons sélectionné des glomérules représentatifs des variations extrêmes du déploiement astrocytaire (au sein des glomérules), précédemment observées entre les animaux nourris et à jeun 17h. Les résultats sont présentés dans la figure 57.

Les glomérules sélectionnés chez les rats à jeun 17h ont une augmentation de 90.7% du marquage GFAP/glomérule, comparativement aux rats nourris ($p=0.0012$), et présentent une augmentation de 134.8% du nombre de branches ($p=0.0004$), de 187.5% du nombre d'intersections ($p=0.0008$) et une diminution de 13.78% de la longueur moyenne des branches ($p=0.0012$).

L'augmentation de la GFAP chez les rats à jeun 17h est donc associée à une complexification du réseau astrocytaire comparativement aux animaux nourris *ad libitum*.

2. Expression protéique des principaux marqueurs astrocytaires du bulbe olfactif en fonction de l'état nutritionnel des rats

Expression de la GFAP (Glial Fibrillary Acid Protein)

La quantité de GFAP mesurée par western blot sur des homogénats de bulbe olfactif n'est pas différente entre les groupes de rats à jeun et le groupe de rats nourris (Figure 58). L'augmentation du marquage GFAP au sein des glomérules n'est donc pas liée à une augmentation de l'expression de la protéine GFAP au sein du BO entier.

Expression de marqueurs de l'activité astrocytaire (GS : glutamine synthétase et GLAST : Glutamate-AspartateTransporter)

La GS, protéine astrocytaire qui régule l'approvisionnement du neurone en glutamine, et GLAST un transporteur astrocytaire du glutamate, contribuent à réguler la neurotransmission glutamatergique dans le BO. L'analyse d'expression de ces deux peptides est présentée sur la figure 59.

Les résultats ne montrent pas de différence significative pour l'expression protéique de la GS et de GLAST, mesurée par western blot sur des homogénats de BO, entre les différents modèles de jeûne comparativement aux animaux nourris.

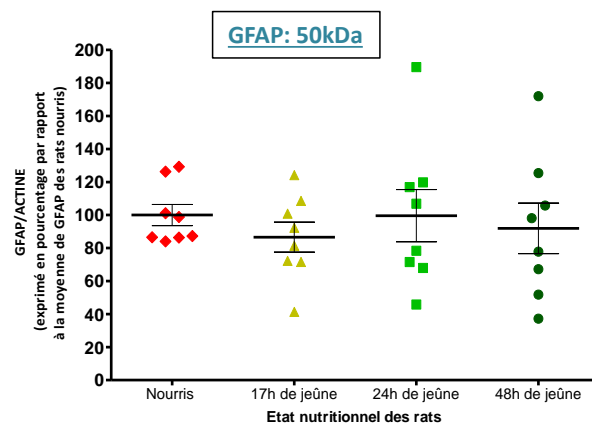


Figure 58: Effet du jeûne sur la quantité totale de GFAP dans les BO

La quantité de GFAP a été mesurée par western blot sur les bulbes olfactifs prélevés au sacrifice des rats à l'issue des différentes durées de jeûne. Les valeurs représentent la moyenne \pm S.E.M. de $n=8$ rats par groupe et correspondent au ratio d'intensité de la bande marquée pour la GFAP (50 kD) sur celle de l'actine (42 kD), exprimé en pourcentage de la moyenne des contrôles (rats nourris) sur le même gel. Les données ont été comparées par un test de permutation (5000 permutations - Logiciel R) avec une correction de « Bonferroni » : $p \leq 0,05$.

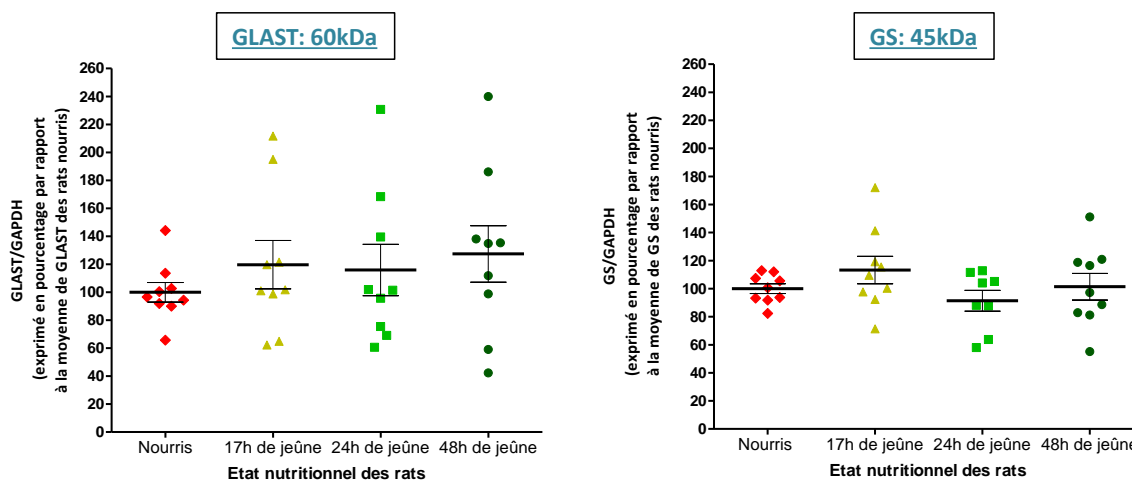


Figure 59: Effet du jeûne sur les marqueurs de la régulation astrocytaire de la synapse glutamatergique (GLAST et GS) dans les BO

Les protéines GLAST (principal transporteur astrocytaire du glutamate dans le BO) et GS (Glutamine Synthétase, métabolisant le glutamate en glutamine) ont été quantifiées par western blot dans les BO prélevés au sacrifice des rats à l'issue des différentes durées de jeûne.

Les valeurs sont représentées par la moyenne \pm S.E.M. de $n=9$ rats par groupe et correspondent au ratio d'intensité des bandes marquées pour GLAST (60kD) ou GS (45kD) sur celle de la GAPDH (37kD), exprimé en pourcentage des moyennes de GLAST ou GS des contrôles (rats nourris) sur le même gel. Les données sont comparées par un test de permutation (5000 permutations - Logiciel R) avec une correction de « Bonferroni » : $p \leq 0,05$.

3. Etude du recouvrement astrocytaire dans la couche plexiforme externe bulbaire en fonction de l'état nutritionnel

Dans le but de vérifier si les variations du marquage GFAP observées en fonction des différents états nutritionnel sont spécifiquement localisées au niveau des glomérules ou généralisées au niveau des différentes couches du BO, nous avons quantifié le pourcentage du marquage de la GFAP au sein de la couche plexiforme externe. Cette couche riche en astrocytes (figure 56) est traversée par les dendrites des cellules mitrales, à panache et granulaires, et est adjacente à la couche glomérulaire. Les résultats sont présentés sur la figure 60.

Quelle que soit la durée du jeûne ou la région du BO, le pourcentage de l'aire GFAP au sein de la couche plexiforme externe, chez les rats à jeun, n'est significativement pas différent de celui des rats nourris *ad libitum* et représente en moyenne 17.6 % de l'aire de cette couche. Ce pourcentage est plus bas en valeur absolue que dans la couche glomérulaire.

L'augmentation du déploiement astrocytaire observée au sein des glomérules du BO des rats à jeun (17h et 24h) comparativement aux rats nourris est donc spécifique des glomérules, et ne semble pas généralisée à l'ensemble des différentes couches du BO.

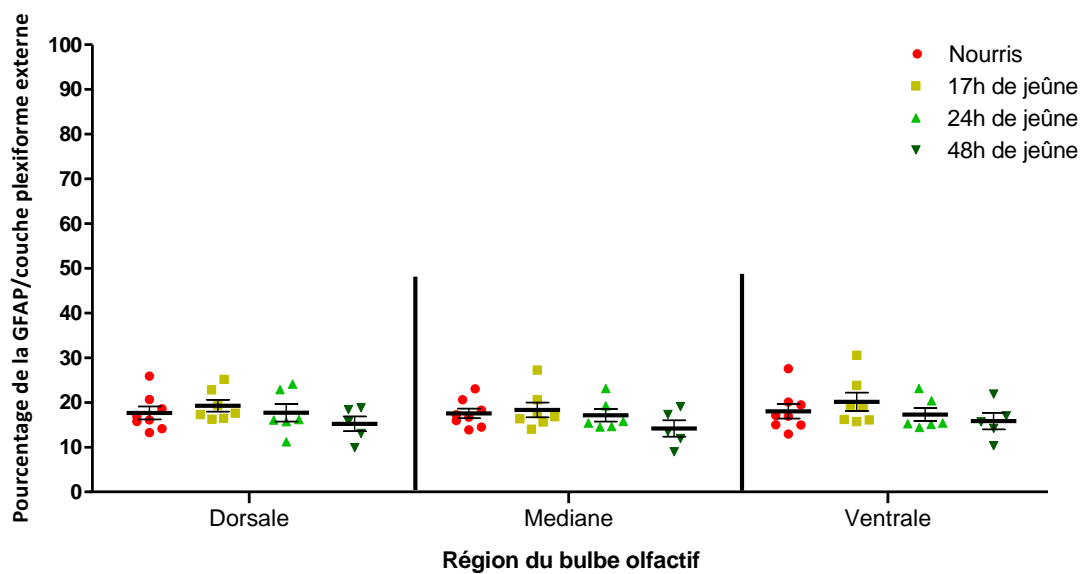


Figure 60: Effet du jeûne sur le déploiement astrocytaire dans la couche plexiforme externe du BO

L'aire marquée pour la GFAP, rapportée à l'aire de la couche plexiforme externe, sur chaque photo prise à l'objectif 20X, permet de quantifier le déploiement astrocytaire dans cette zone du BO.

Les données représentent la moyenne \pm S.E.M. des mesures réalisées sur 2 à 3 coupes/rat pour $n=5$ à 7 rats par groupe, et sont comparées par un test de permutation (5000 permutations - Logiciel R) avec une correction de « Bonferroni » : $p \leq 0,05$.

Résumé: Effet du jeûne sur le déploiement des astrocytes glomérulaires du bulbe olfactif

Un jeûne de 17h entraîne une augmentation de plus de 40% du déploiement astrocytaire dans l'ensemble des glomérules du BO, comparativement aux rats nourris. Cette augmentation est également observée pour une durée de jeûne de 24h, mais de façon plus localisée (régions médiane et ventrale seulement), et annulée avec un jeûne de 48h. Cette augmentation semble spécifiquement localisée au niveau des glomérules. L'augmentation du déploiement astrocytaire ne s'accompagne pas de modification dans l'expression protéique des marqueurs astrocytaire GLAST et GS, ni même dans l'expression de la GFAP, dans l'ensemble du BO.

A partir de ces observations, nous avons choisi de cibler la suite de notre étude sur le jeûne de 17h, moins sévère que celui de 24h et 48h, et qui présente une augmentation maximale du déploiement astrocytaire comparativement aux animaux nourris *ad libitum*.

Dans la suite de notre travail, nous avons cherché à comprendre les mécanismes permettant de moduler la morphologie des astrocytes glomérulaires en fonction de l'état métabolique. Pour cela, deux modèles ont été utilisés :

- un modèle *in vivo* d'injections par voie intra-péritonéale (i.p.) de glucose ou de peptides régulant la prise alimentaire (orexigènes ou anorexigènes) chez des rats rassasiés ou à jeun pendant 17h ;
- un modèle *ex vivo* de tranches de BO de rats maintenues en survie dans un tampon mimant le liquide céphalo-rachidien (ACSF), sur lesquelles sont appliqués ces différents peptides (orexigènes ou anorexigènes), ou un tampon ACSF plus ou moins appauvri en glucose.

Comme précédemment, et pour l'ensemble des expérimentations suivantes, l'analyse du déploiement astrocytaire dans les glomérules du BO est réalisée par quantification du marquage de la GFAP au sein des glomérules. La comparaison entre les différents groupes de rats est réalisée sur des coupes équivalentes dans leur positionnement dorso-ventral dans le BO.

III. Rôle des variations glycémiques dans le déploiement des astrocytes glomérulaires du bulbe olfactif

La glycémie augmente en situation de satiété et diminue en situation de jeûne (figure 61). Par ailleurs, les astrocytes assurent le transfert du glucose des capillaires vers les neurones, en s'adaptant à leurs besoins énergétiques (Pellerin et al., 2007). Nous avons donc cherché à évaluer l'implication des variations de la glycémie dans les modifications morphologiques des astrocytes du BO.

1. Etude *in vivo* de l'implication des variations glycémiques dans le déploiement des astrocytes glomérulaires du BO

Afin de savoir si l'hypoglycémie joue un rôle dans l'augmentation du déploiement astrocytaire induit par le jeûne, nous avons comparé le déploiement astrocytaire de rats à jeun 17h ayant reçu une injection i.p. de glucose (rats « glucose ») (2g/kg de poids corporel/ml), avec celui de rats à jeun 17h ayant reçu une injection i.p. de sérum physiologique (rats « sérum phy. »).

a. Vérification de l'efficacité d'injection du glucose : mesure de la glycémie

L'efficacité d'injection du bolus de glucose est contrôlée grâce à la mesure de la glycémie des rats 1h après l'injection. L'objectif étant d'obtenir chez les rats « glucose » une glycémie similaire à celle des rats nourris *ad libitum*, sans réalimentation. L'ensemble des résultats est présenté dans la figure 61.

Les rats nourris présentent une glycémie moyenne de 129.6 mg/dl. Comme attendu, les rats «sérum phy. » ont une glycémie d'environ 76.50 mg/dl, soit une baisse de - 59% comparativement aux rats nourris ($p=0.0012$). En revanche les rats « glucose » ont une glycémie moyenne de 120.1 mg/dl, plus élevée que les rats « sérum phy. » ($p=0.0012$) et similaire à celle des animaux nourris *ad libitum*. Par conséquent, le protocole d'injection du bolus de glucose (mode d'administration, concentration, temps d'action) est satisfaisant pour induire chez des rats à jeun 17h une glycémie correspondant à un état de satiété.

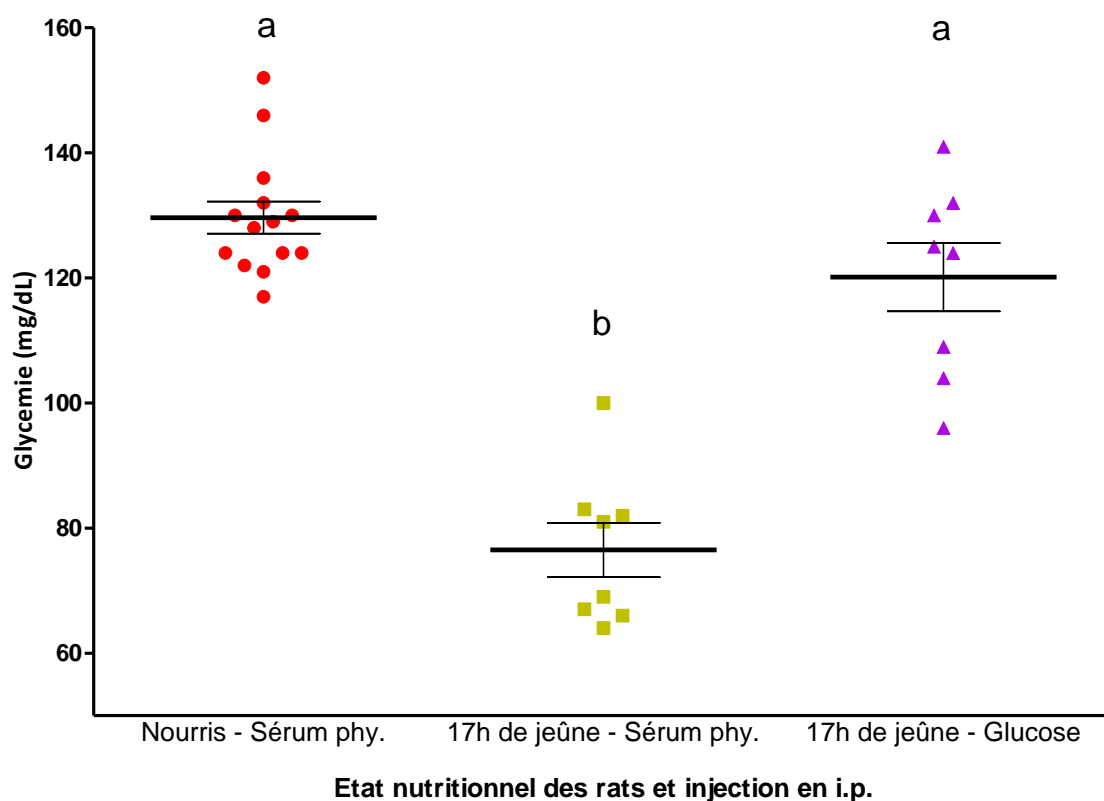


Figure 61: Effet d'une injection de glucose chez des rats à jeun 17h sur la glycémie

Les rats nourris *ad libitum* sont injectés par voie intra-péritonéale avec du sérum physiologique (Sérum phy.). Les rats à jeun depuis 17h sont injectés en i.p. avec du glucose (2g/kg/ml) ou du sérum physiologique. La glycémie est mesurée 1h après injection.

Les données représentent la moyenne \pm S.E.M. de n=14 ou 8 rats par groupe et sont comparées selon un test par permutation (5000 permutations - Logiciel R) avec correction de « Bonferroni »: a**≠**b avec p<0,001.

b. Impact des injections de glucose sur l'expression de peptides hypothalamiques impliqués dans la régulation de la prise alimentaire

Nous n'observons pas de différence significative dans l'expression des ARNm des peptides hypothalamiques régulant la prise alimentaire (NPY, AgRP, POMC, CART, Y2R, MC4R et CRH) entre les groupes de rats « sérum phy. » et « glucose » (figure 52). L'augmentation de la glycémie chez les rats à jeun 17h, ne semble pas suffire pour activer l'expression des peptides hypothalamiques impliqués dans la voie anorexigène.

c. Rôle des variations glycémiques dans le déploiement des astrocytes glomérulaires du bulbe olfactif

Le résultat de la comparaison du recouvrement astrocytaire entre les rats « sérum phy. » et « glucose », est présenté dans la figure 62.

L'injection de glucose chez les rats à jeun entraîne une diminution significative de - 35.3% du marquage de la GFAP dans les glomérules, comparativement aux rats « sérum phys.», quelle que soit la localisation dans le BO ($p < 0.05$ au niveau médian et $p < 0.01$ au niveau dorsal et ventral). Le pourcentage de l'aire GFAP au sein des glomérules est en moyenne de 36.86% chez les animaux « sérum phy. » et de 23.85% chez les animaux « glucose ». Ces valeurs de pourcentage de GFAP sont cohérentes avec celles précédemment obtenues pour les rats à jeun 17h (40,72%) et nourris *ad libitum* (28.33%) (chapitre II. a) 1)).

Par conséquent l'injection de glucose chez des rats à jeun 17h restaure leur glycémie et abolit l'augmentation du déploiement astrocytaire induite par le jeûne.

2. Etude ex vivo de l'implication des variations glycémiques dans le déploiement des astrocytes du bulbe olfactif

Nous avons comparé le déploiement des astrocytes glomérulaires dans des tranches de BO incubées dans un milieu ACSF « standard » dont la concentration en glucose est de 11mM (concentration classiquement utilisée pour maintenir les tranches en survie) et des tranches de BO incubées dans deux milieux ACSF appauvris en glucose (5mM ou 2.5mM de glucose) dans le but de mimer un environnement hypoglycémique (Tucker et al., 2013b). Le résultat de l'analyse du marquage de la GFAP au sein des glomérules bulbaires est présenté dans la figure 63.

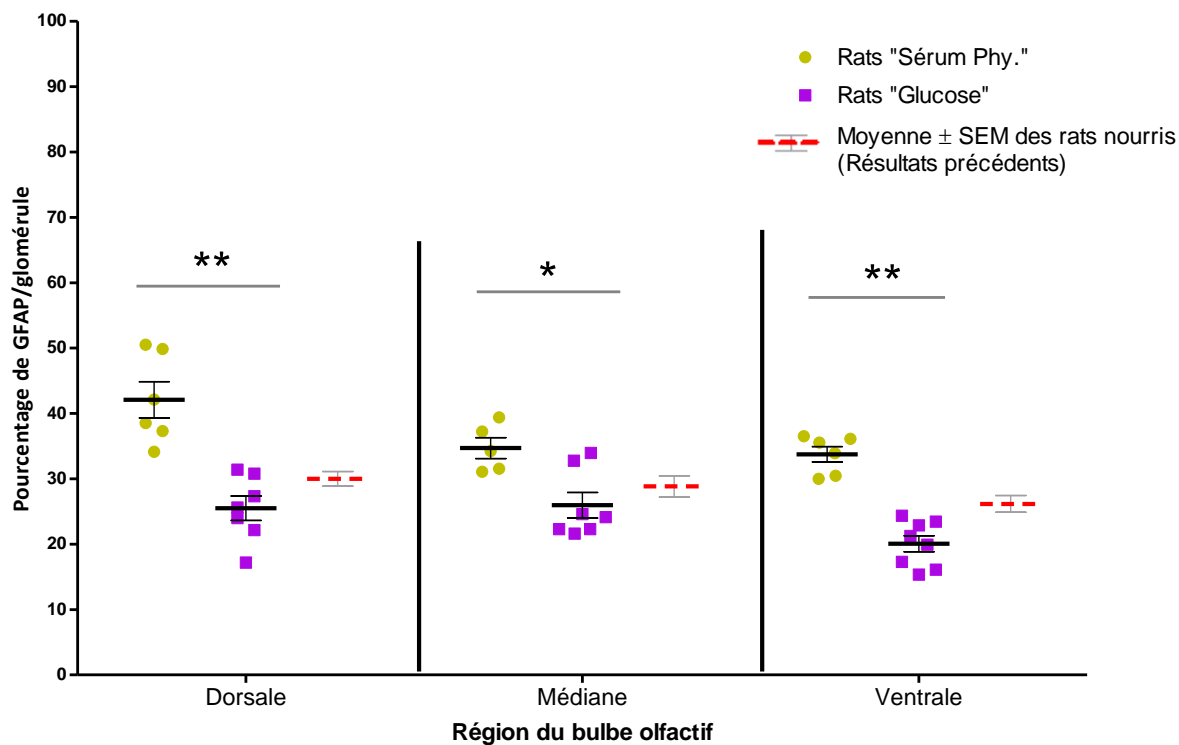


Figure 62: Effet d'une injection de glucose chez des rats à jeun 17h sur le déploiement astrocytaire dans les glomérules du BO

Les rats à jeun depuis 17h sont injectés par voie intra-péritonéale avec du glucose (2µg/kg/ml - Rats « glucose ») ou de sérum physiologique (rats « Sérume Phy. »). L'aire marquée pour la GFAP, exprimée en pourcentage de l'aire totale de chaque glomérule, mesure le niveau du déploiement astrocytaire dans les glomérules bulbares. Les marquages immuno-histochimiques ont été réalisés sur des coupes de bulbes olfactifs prélevés au sacrifice des rats 1 heure après l'injection.

Les données représentent la moyenne ± S.E.M. des mesures réalisées sur 40 à 60 glomérules/coupe, sur 2 coupes/région du BO/rat, pour n= 6 rats par groupe. Elles sont comparées par un test de permutation (5000 permutations - Logiciel R) avec une correction de « Bonferroni » : *p<0.05, **p<0,01.

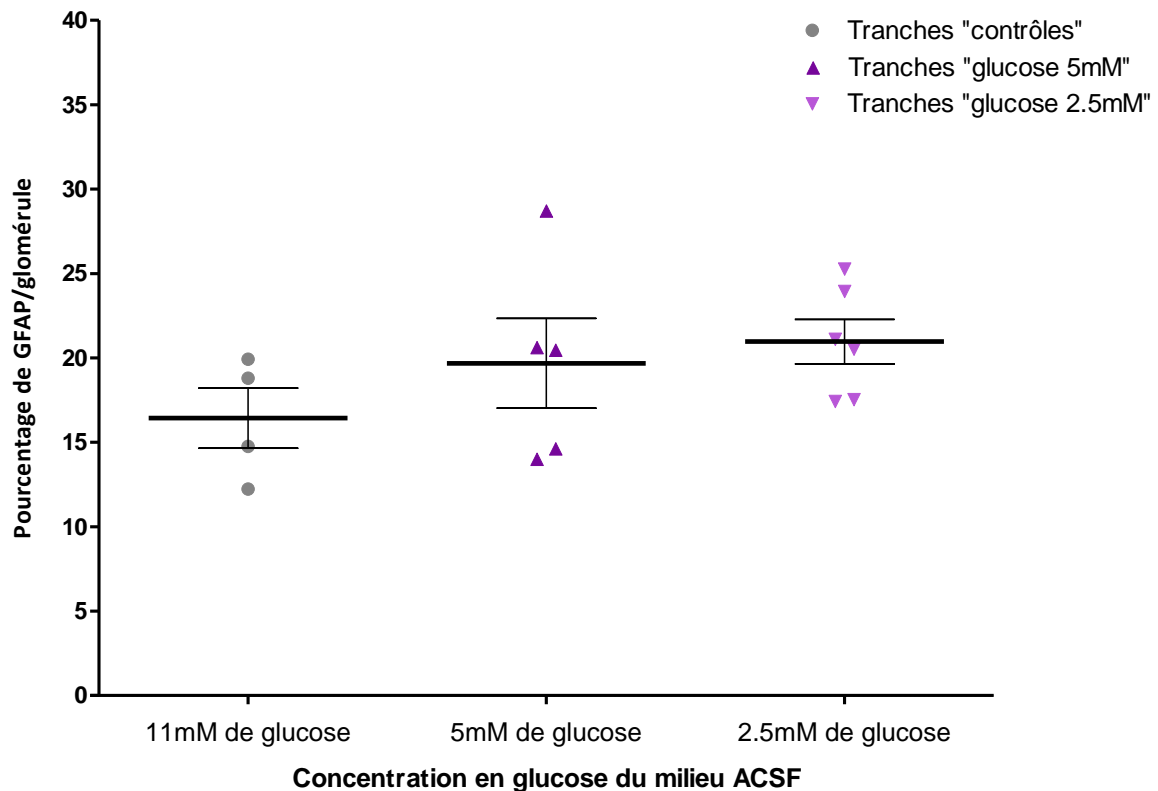


Figure 63: Effet d'un milieu ACSF appauvri en glucose sur le déploiement astrocytaire dans les glomérules de tranches de BO maintenues en survie

L'aire marquée pour la GFAP, exprimée en pourcentage de l'aire totale de chaque glomérule, mesure le niveau du déploiement astrocytaire dans les glomérules bulbaires. Les marquages immuno-histochimiques ont été réalisés sur des tranches de bulbes olfactifs maintenues en survie dans un milieu ACSF classique dont la concentration en glucose est de 11mM ou appauvri en glucose (5mM et 2,5mM).

Les données représentent la moyenne \pm S.E.M. des mesures réalisées sur 3 à 4 glomérules/tranche pour n= 4 à 6 tranches par condition (n= 1 rat). Elles sont comparées par un test de permutation (5000 permutations - Logiciel R) avec une correction de « Bonferroni » : *p \leq 0.05.

Nous n'observons pas de différence du pourcentage de marquage GFAP au sein des glomérules entre les tranches ayant été incubées dans un milieu appauvri en glucose (5 mM ou 2,5 mM) et les tranches « standard » à 11mM.

La diminution du taux de glucose disponible dans l'environnement astrocytaire ne semble pas modifier le déploiement des astrocytes au sein des glomérules bulbaires, sur le modèle « tranches ». Cependant ces résultats sont préliminaires (n= 1 rat) et restent à confirmer avec un nombre d'échantillons plus grand (en cours de reproduction).

IV. Implication des peptides régulant la prise alimentaire dans le déploiement des astrocytes du bulbe olfactif

Selon l'état nutritionnel des individus, différents peptides orexigènes (Ghréline, NPY) et anorexigènes (PYY3-36, Leptine) sont synthétisés et libérés au niveau périphérique (tractus gastro-intestinal) et central, notamment au niveau du BO (Introduction : chapitre II. 3.). Par ailleurs, les astrocytes du SNC, en contact avec les capillaires, sont capables d'exprimer la plupart des récepteurs à ces peptides et d'y répondre (Leptine, ghréline, insuline – Introduction : chapitre II 3. b. 2). Par conséquent, nous avons cherché à évaluer l'implication de ces peptides dans les modifications du déploiement astrocytaire observées en fonction du statut nutritionnel des rats.

A. Etude *in vivo* de l'implication des peptides régulant la prise alimentaire dans le déploiement des astrocytes du bulbe olfactif

1. Impact de la ghréline (orexigène) sur le déploiement des astrocytes glomérulaires du bulbe olfactif

La ghréline est un peptide orexigène sécrété par l'estomac en anticipation du repas. Afin d'évaluer l'implication de ce peptide dans l'augmentation du déploiement astrocytaire induit par le jeûne, nous avons comparé le recouvrement astrocytaire des glomérules bulbaires de rats nourris ayant reçu une injection i.p. de ghréline (rats « ghréline ») (40µg/kg de poids corporel/ml) avec celui de rats nourris ayant reçu une injection i.p. de sérum physiologique (rats « sérum phy. »).

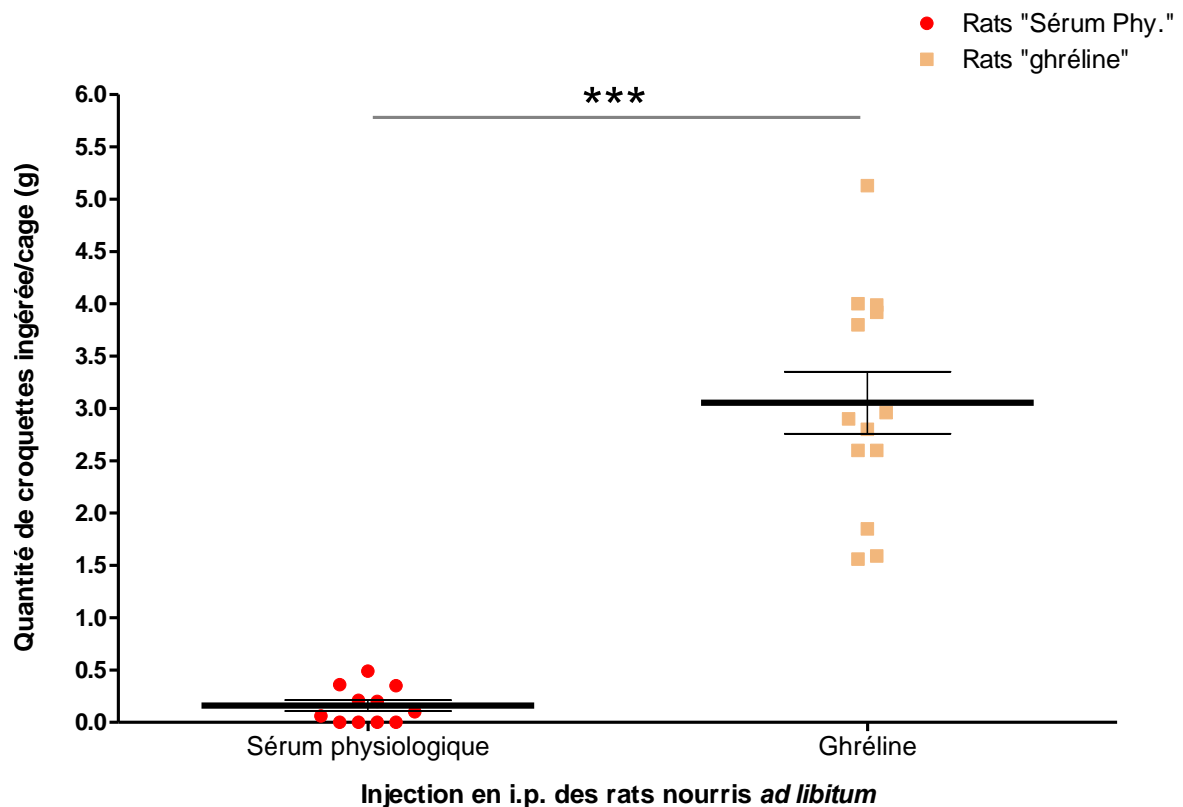


Figure 64: Effet d'une injection de ghréline (peptide orexigène) sur la prise alimentaire chez des rats nourris

Les rats sont nourris *ad libitum* et reçoivent une injection par voie intra-péritonéale de ghréline (40µg/kg/ml - Rats « ghréline ») ou de sérum physiologique (rats « Sérum Phy. »). La prise alimentaire est mesurée directement après les injections et représente la quantité de croquettes ingérée sur une période d'une heure. Le résultat est exprimé en gramme (g).

Les données sont représentées par la moyenne \pm S.E.M. de n= 11 à 13 cages par groupe (2 rats/cage) et comparées par un test de permutation (5000 permutations - Logiciel R) avec une correction de « Bonferroni ». ***p \leq 0.001.

Figure A: NPY

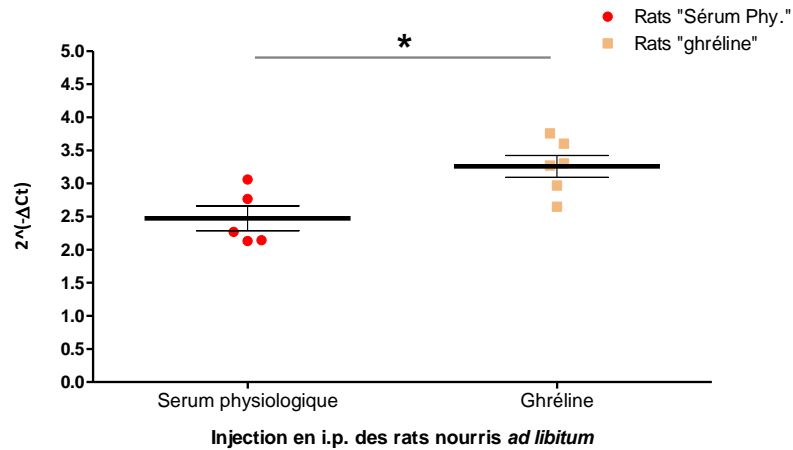


Figure B: MC4R

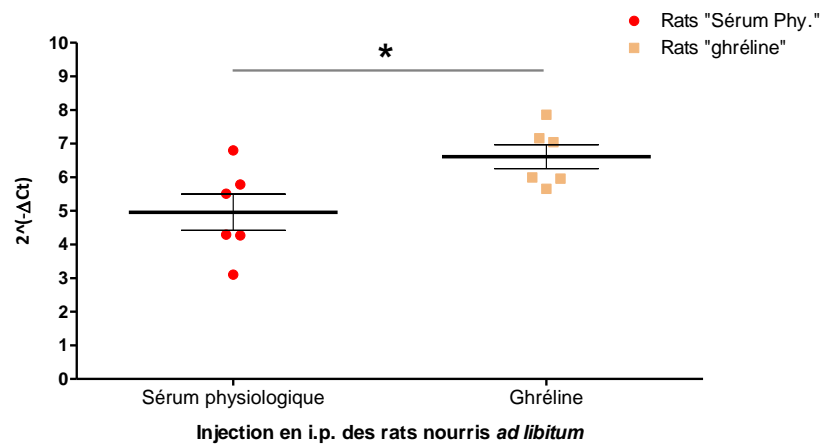


Figure C: CRH

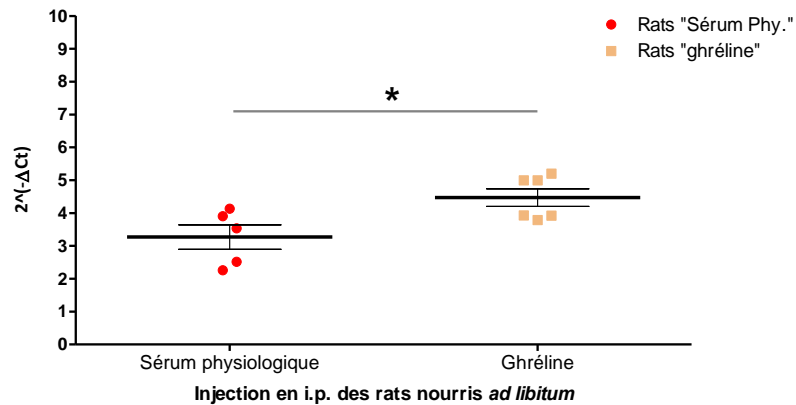


Figure 65: Effet d'une injection de ghréline (peptide orexigène) chez des rats nourris sur l'expression des ARNm du NPY (peptide orexigène), MC4R et CRH (peptides anorexigènes) dans l'hypothalamus

Les rats sont nourris *ad libitum* et reçoivent une injection par voie intra-péritonéale de ghréline (40 μ g/kg/ml - Rats « ghréline ») ou de sérum physiologique (rats « sérum Phy. »).

L'expression des ARNm du NPY (Figure A), MC4R (Figure B) et CRH (Figure C) a été analysée par PCR quantitative en temps réel sur l'hypothalamus prélevé au sacrifice des rats 1h après injection. Le résultat est exprimé en valeur absolue ($2^{-\Delta Ct}$) avec une normalisation avec le gène de référence 18S.

Les données sont représentées par la moyenne \pm S.E.M. de n = 5 à 6 rats par groupe et comparées par un test de permutation (5000 permutations - Logiciel R) avec une correction de « Bonferroni ». * $p \leq 0.05$.

a. Vérification de l'efficacité d'injection de la ghréline : mesure de la prise alimentaire (figure 64)

L'efficacité d'injection de ghréline est contrôlée par l'analyse de la quantité de croquettes ingérée par les rats, pendant 1 heure, après injection.

La quantité de croquette ingérée est significativement plus élevée ($p < 0.001$) chez les rats « ghréline » avec une consommation moyenne de 3.05g de croquettes/cage (2 rats), comparativement aux rats « sérum phy. » dont la consommation moyenne est de 0.016g de croquettes/cage.

Par conséquent, le protocole d'injection de la ghréline (mode d'administration, concentration, temps d'action) permet d'induire chez des rats nourris *ad libitum*, une augmentation de la prise alimentaire au cours de leur phase de repos.

b. Impact des injections de ghréline sur l'expression de peptides hypothalamiques impliqués dans la régulation de la prise alimentaire

Comparativement aux rats « sérum phy. », on observe chez les rats « ghréline » une augmentation significative de + 31.74% de l'expression des ARNm du peptide orexigène NPY, de + 33.33% de l'expression des ARNm du récepteur anorexigène MC4R et de + 36.77% de l'expression des ARNm du peptide anorexigène CRH (figure 65) ($p < 0.05$ vs groupe « sérum phy. »). En revanche, nous n'observons pas de différence significative dans l'expression des peptides anorexigènes AgRP, POMC, CART et Y2R entre les groupes « sérum phy. » et « ghréline » (Figure 52).

Le protocole d'injection de la ghréline chez des rats nourris *ad libitum* semble activer la voie orexigène de l'hypothalamus, *via* l'augmentation de l'expression du peptide orexigène NPY (neurones NPY/AgRP), mais également, et de façon étonnante, la voie anorexigène par l'augmentation de l'expression du peptide anorexigène CRH et du récepteur anorexigène MC4R (activé par les neurones anorexigènes POMC/CART et inhibé par le peptide orexigène AgRP).

c. Etude de l'implication de la ghréline dans le déploiement des astrocytes glomérulaires du bulbe olfactif

Le résultat de la comparaison du déploiement astrocytaire entre les rats « ghréline » et « sérum phy.» est présenté dans la figure 66.

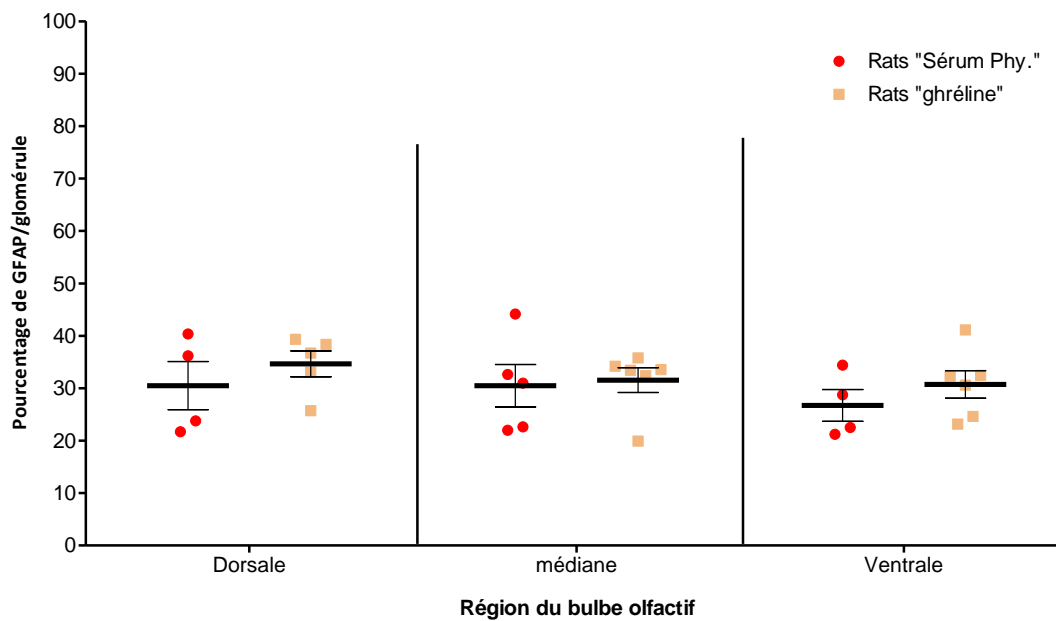


Figure 66: Effet d'une injection de ghréline (peptide oréxigène) chez des rats nourris sur le déploiement astrocytaire dans les glomérules du BO

Les rats sont nourris *ad libitum* et reçoivent une injection par voie intra-péritonéale de ghréline (40µg/kg/ml - Rats « ghréline ») ou de sérum physiologique (rats « Sérum Phy. »). L'aire marquée pour la GFAP, exprimée en pourcentage de l'aire totale de chaque glomérule, mesure le niveau du déploiement astrocytaire dans les glomérules bulbares. Les marquages immuno-histochimiques ont été réalisés sur des coupes de bulbes olfactifs prélevés au sacrifice des rats 1 heure après l'injection.

Les données représentent la moyenne ± S.E.M. des mesures réalisées sur 40 à 60 glomérules/coupe, sur 2 coupes/région du BO/rat, pour n= 6 rats par groupe. Elles sont comparées par un test de permutation (5000 permutations - Logiciel R) avec une correction de « Bonferroni » : p<0.05

Les résultats obtenus ne montrent pas de différence significative du pourcentage de marquage GFAP au sein des glomérules entre les rats « ghréline » et les rats « sérum phy. », et cela quelle que soit la localisation dans le BO. Par conséquent l'injection de ghréline chez des rats nourris *ad libitum*, bien que stimulant la prise alimentaire, n'a pas d'action sur le déploiement astrocytaire des glomérules bulbaires.

2. Impact de peptides anorexigènes sur le déploiement des astrocytes glomérulaires du bulbe olfactif

a. Effet du PYY3-36 sur le déploiement des astrocytes glomérulaires du bulbe olfactif

Le PYY 3-36 est un peptide anorexigène sécrété par les cellules endocrines de l'intestin et du côlon, en réponse à la prise alimentaire. Afin d'évaluer l'implication de ce peptide dans la diminution du déploiement astrocytaire observée en situation de satiété, nous avons comparé le déploiement astrocytaire des glomérules bulbaires de rats à jeun 17h ayant reçu une injection i.p. de PYY3-36 (100µg/kg de poids corporel/ml) (rats « PYY3-36 »), avec celui de rats à jeun 17h ayant reçu une injection i.p. de sérum physiologique (rats « sérum phy. »).

Vérification de l'efficacité d'injection PYY3-36 : mesure de la prise alimentaire (figure 67)

L'efficacité d'injection du PYY3-36 est contrôlée grâce à l'analyse de la quantité de croquettes ingérée par les rats, pendant 1 heure, après injection.

La quantité de croquettes ingérée par les rats « PYY3-36 » est diminuée de -17,81% comparativement aux rats « sérum phy. » ($p < 0.001$). Par conséquent le protocole d'injection du PYY3-36 (mode d'administration, concentration, temps d'action) induit bien chez des rats à jeun 17h une diminution quantitative de la prise alimentaire au cours d'une période de réalimentation.

Impact des injections de PYY3-36 sur l'expression de peptides hypothalamiques impliqués dans la régulation de la prise alimentaire

Nous n'observons pas de différence dans l'expression hypothalamique des ARNm des peptides régulant la prise alimentaire (NPY, AgRP, POMC, CART, Y2R, MC4R et CRH) entre les groupes « sérum phy. » et « PYY3-36 » (figure 52). L'injection du PYY3-36 chez des rats à jeun 17h non réalimentés, ne semble pas suffisante pour activer l'expression des peptides hypothalamiques impliqués dans la voie anorexigène.

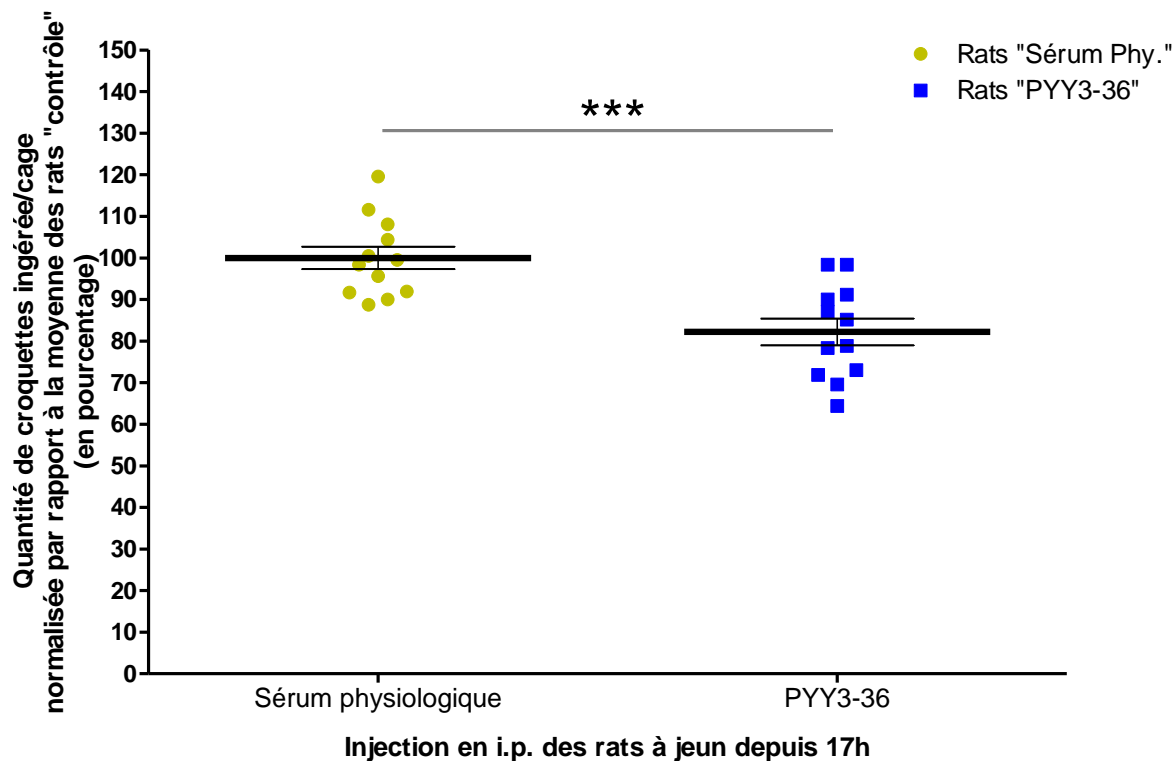


Figure 67: Effet d'une injection de PYY3-36 (peptide anorexigène) chez des rats à jeun pendant 17h sur la prise alimentaire

Les rats à jeun depuis 17h sont injectés par voie intra-péritonéale avec du PYY3-36 (100µg/kg/ml - Rats « PYY3-36 ») ou du sérum physiologique (rats « Sérum Phy. »). La prise alimentaire est mesurée directement après les injections et représente la quantité de croquettes ingérée sur une période d'une heure. Le résultat est normalisé par rapport à la moyenne des rats « Sérum Phy. » et exprimé en pourcentage .

Les données sont représentées par la moyenne \pm S.E.M. de n= 12 cages par groupe (2 rats/cage) et comparées par un test de permutation (5000 permutations - Logiciel R) avec une correction de « Bonferroni » . ***p \leq 0.001.

Etude de l'implication du PYY3-36 dans le déploiement des astrocytes glomérulaires de bulbe olfactif

Le résultat de la comparaison du déploiement astrocytaire entre les rats « PYY3-36 » et « sérum phy.» est présenté dans la figure 68.

Comparativement aux rats « sérum phy. », nous observons dans le BO de rats « PYY3-36 » une diminution de -27.89% du marquage de la GFAP au sein des glomérules, et cela quelle que soit la localisation dans le BO ($p < 0.05$ au niveau dorsal et $p < 0.01$ au niveau médian et ventral). De plus le pourcentage de GFAP au sein des glomérules est en moyenne de 36.86% chez les animaux « sérum phy. » et de 26.58% chez les animaux « PYY3-36 ». Ces valeurs sont cohérentes avec celles précédemment obtenues pour les rats à jeun 17h (40,72%) et nourris *ad libitum* (28.33%) (chapitre II. a) 1)).

Par conséquent l'injection de PYY3-36 chez des rats à jeun 17h réduit leur prise alimentaire et abolit l'augmentation du déploiement astrocytaire induite par le jeûne.

b. Impact de la leptine sur le déploiement des astrocytes glomérulaires du bulbe olfactif

La leptine, peptide anorexigène sécrété par le tissu adipeux proportionnellement aux réserves lipidiques, en réponse aux apports énergétiques, contribue à réduire la prise alimentaire. Afin d'étudier l'implication de ce peptide dans la rétraction des prolongements astrocytaires observée chez les animaux nourris, nous avons comparé le déploiement astrocytaire des glomérules bulbaires de rats à jeun 17h ayant reçu une injection i.p. de leptine (25µg/kg de poids corporel/ml) (rats « leptine »), avec celui de rats à jeun 17h ayant reçu une injection i.p. de sérum physiologique (rats « sérum phy. »).

Vérification de l'efficacité d'injection de la leptine : mesure de la prise alimentaire

L'efficacité d'injection de la leptine est contrôlée grâce à l'analyse de la quantité de croquette ingérée par les rats, pendant 1 heure, après injection (figure 69).

La quantité de croquettes ingérée par les rats « leptine » est significativement diminuée de -23.14% comparativement aux rats « sérum phy. » ($p < 0.05$). Par conséquent le protocole d'injection de la leptine (mode d'administration, concentration, temps d'action) est satisfaisant pour induire chez des rats à jeun 17h une diminution quantitative de la prise alimentaire au cours d'une période de réalimentation.

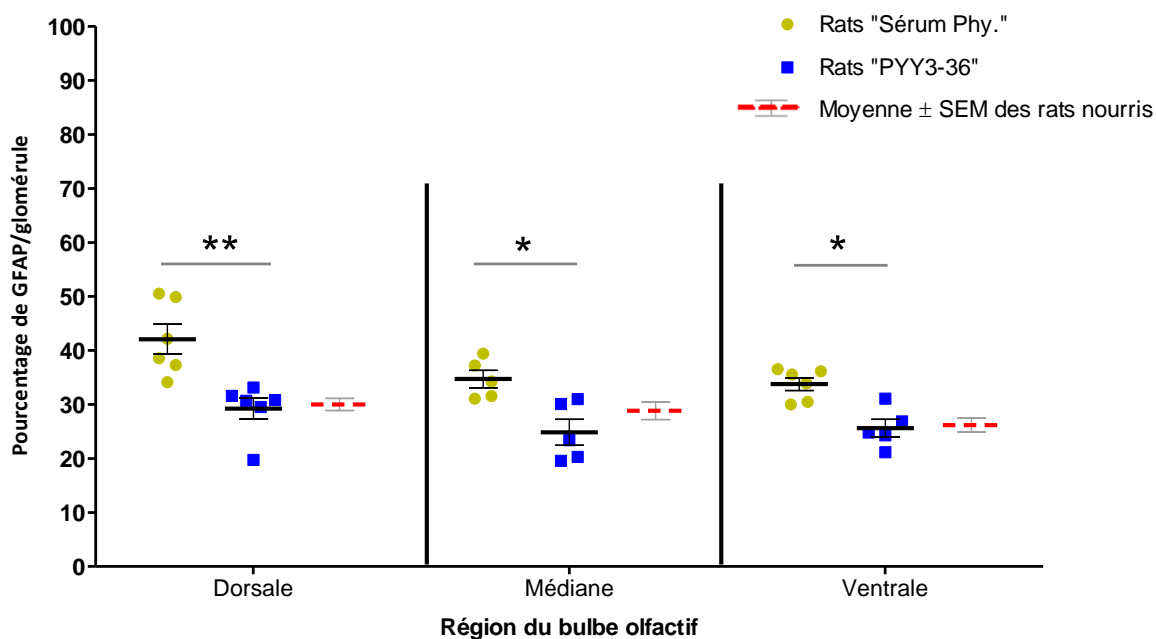


Figure 68: Effet d'une injection de PYY3-36 (peptide anorexigène) chez des rats à jeun 17h sur le déploiement astrocytaire dans les glomérules du BO:

Les rats à jeun depuis 17h sont injectés par voie intra-péritonéale avec du PYY3-36 (100µg/kg/ml - Rats « PYY3-36 ») ou de sérum physiologique (rats « Sérum Phy. »). L'aire marquée pour la GFAP, exprimée en pourcentage de l'aire totale de chaque glomérule, mesure le niveau du déploiement astrocytaire dans les glomérules bulbaire. Les marquages immuno-histochimiques ont été réalisés sur des coupes de bulbes olfactifs prélevés au sacrifice des rats, 1 heure après l'injection.

Les données représentent la moyenne ± S.E.M. des mesures réalisées sur 40 à 60 glomérules/coupe, sur 2 coupes/région du BO/rat, pour n= 6 rats par groupe. Elles sont comparées par un test de permutation (5000 permutations - Logiciel R) avec une correction de « Bonferroni » : *p≤0.05, **p≤0,01.

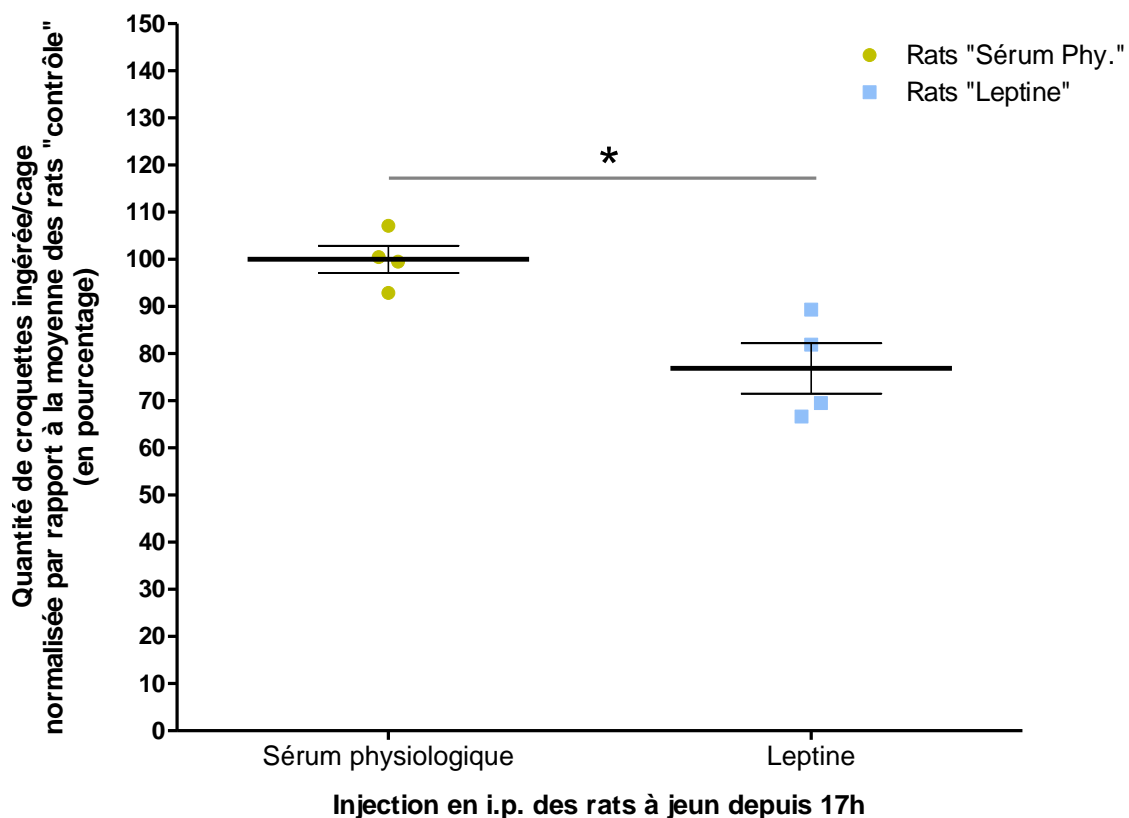


Figure 69: Effet d'une injection de leptine (peptide anorexigène) chez des rats à jeun pendant 17h sur la prise alimentaire

Les rats à jeun depuis 17h sont injectés par voie intra-péritonéale avec de la leptine (25µg/kg/ml - Rats « Leptine ») ou du sérum physiologique (rats « Sérum Phy. »). La prise alimentaire est mesurée directement après les injections et représente la quantité de croquettes ingérée sur une période d'une heure. Le résultat est normalisé par rapport à la moyenne des rats « contrôle » et exprimé en pourcentage .

Les données sont représentées par la moyenne \pm S.E.M. de n= 4 cages par groupe (2 rats/cages) et comparées par un test de permutation (5000 permutations - Logiciel R) avec une correction de « Bonferroni » . *p \leq 0.05.

Impact des injections de leptine sur l'expression de peptides hypothalamiques impliqués dans la régulation de la prise alimentaire

Pour des raisons matérielles, la quantification des ARNm des peptides hypothalamiques régulant la prise alimentaire (NPY, AgRP, POMC, CART, Y2R, MC4R et CRH) des groupes « sérum phy. » et « leptine » n'a pu être réalisée au cours de ma thèse mais sera effectuée ultérieurement.

Etude de l'implication de la leptine dans le déploiement des astrocytes glomérulaires de bulbe olfactif

Le résultat de la comparaison du déploiement astrocytaire entre les rats « leptine » et « sérum phy. », est présenté dans la figure 70.

Les résultats obtenus ne montrent pas de différence significative du pourcentage de marquage GFAP au sein des glomérules entre les groupes « leptine » et « sérum phy. », et cela quelle que soit la localisation dans le BO.

Par conséquent, l'injection de leptine chez des rats à jeun 17h réduit la prise alimentaire des rats, mais n'a pas d'action sur le déploiement astrocytaire des glomérules bulbares.

Pour résumer brièvement, l'injection du peptide anorexigène PYY3-36 ou de glucose chez des rats à jeun, permet d'abolir le déploiement astrocytaire induit par le jeûne. En revanche l'injection de leptine (anorexigène) chez les rats à jeun ou de ghréline (orexigène) chez les rats nourris n'ont pas eu d'action sur le déploiement astrocytaire.

B. Etude ex vivo de l'implication des peptides régulant la prise alimentaire dans le déploiement des astrocytes du bulbe olfactif

Dans le but d'affiner nos résultats *in vivo* et d'étudier plus directement l'implication des peptides orexigènes (ghréline et NPY) et anorexigènes (PYY3-36 et leptine) dans le déploiement des astrocytes glomérulaires, nous avons à nouveau utilisé le modèle *ex vivo* de tranches de BO maintenues en survie. Ce modèle permet d'étudier l'action directe de ces peptides en s'affranchissant des multiples boucles de régulations complexes de la prise alimentaire (hypothalamus, système digestif etc...).

Pour l'ensemble des expérimentations suivantes, les tranches de BO sont incubées pendant 1 heure en présence d'un peptide orexigène ou anorexigène (tranches « peptide »), puis le déploiement des astrocytes glomérulaires de ces tranches est comparé à celui de tranches « contrôle » (incubées dans un milieu ACSF non additionné de peptide)

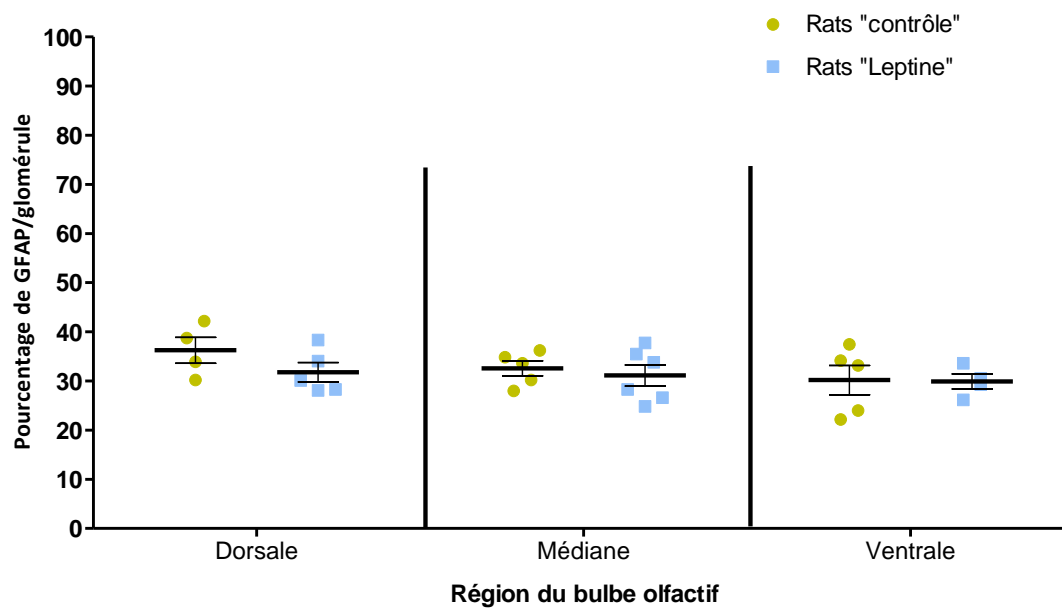


Figure 70: Effet d'une injection de leptine (peptide anorexigène) chez des rats à jeun 17h sur le déploiement astrocytaire dans les glomérules du BO

Les rats à jeun depuis 17h sont injectés par voie intra-péritonéale avec de la leptine (25µg/kg/ml - Rats « Leptine ») ou de sérum physiologique (rats « Sérum Phy. »). L'aire marquée pour la GFAP, exprimée en pourcentage de l'aire totale de chaque glomérule, mesure le niveau du déploiement astrocytaire dans les glomérules bulbaires. Les marquages immuno-histochimiques ont été réalisés sur des coupes de bulbes olfactifs prélevés au sacrifice des rats, 1 heure après l'injection.

Les données représentent la moyenne ± S.E.M. des mesures réalisées sur 40 à 60 glomérules/coupe, sur 2 coupes/région du BO/rat, pour n= 5 à 6 rats par groupe. Elles sont comparées par un test de permutation (5000 permutations - Logiciel R) avec une correction de « Bonferroni » : *p≤0.05.

1. Impact des peptides orexigènes sur le déploiement des astrocytes glomérulaires du bulbe olfactif

a. Impact de la ghréline sur la plasticité morphologique des astrocytes glomérulaires du bulbe olfactif

Le résultat de l'analyse de la GFAP au sein des glomérules bulbaires des tranches « ghréline » (30nM) et « contrôle » est présenté dans la figure 71.

Comparativement aux tranches « contrôle », les tranches « ghréline » (30nM) présentent une augmentation significative de +23.9% du marquage de la GFAP au sein des glomérules ($p < 0.01$). Par conséquent, alors que l'injection i.p. de ghréline chez des rats nourris ne modifiait pas le niveau du déploiement des astrocytes dans les glomérules, l'application directe de ghréline entraîne une augmentation du déploiement astrocytaire glomérulaire sur des tranches de BO.

b. Impact du NPY sur le déploiement des astrocytes glomérulaires du bulbe olfactif

Le NPY est un neuropeptide orexigène libéré au niveau de l'hypothalamus en condition de jeûne, en réponse au pic de ghréline anticipant les repas, ou comme nous l'avons observé précédemment, en réponse à une injection i.p. de ghréline chez des rats nourris *ad libitum* (Chapitre IV. A. 1. b)).

Le résultat de l'analyse de la GFAP au sein des glomérules bulbaires des tranches « NPY » (1 μ M) et « contrôle » est présenté dans la figure 72.

Comparativement aux tranches « contrôle », les tranches « NPY » (1 μ M) présentent une augmentation significative de +29.9% du marquage de la GFAP au sein des glomérules ($p < 0.05$). Par conséquent, l'application directe du NPY, comme celle de ghréline, sur des tranches de BO, entraîne une augmentation du déploiement astrocytaire glomérulaire chez le rat.

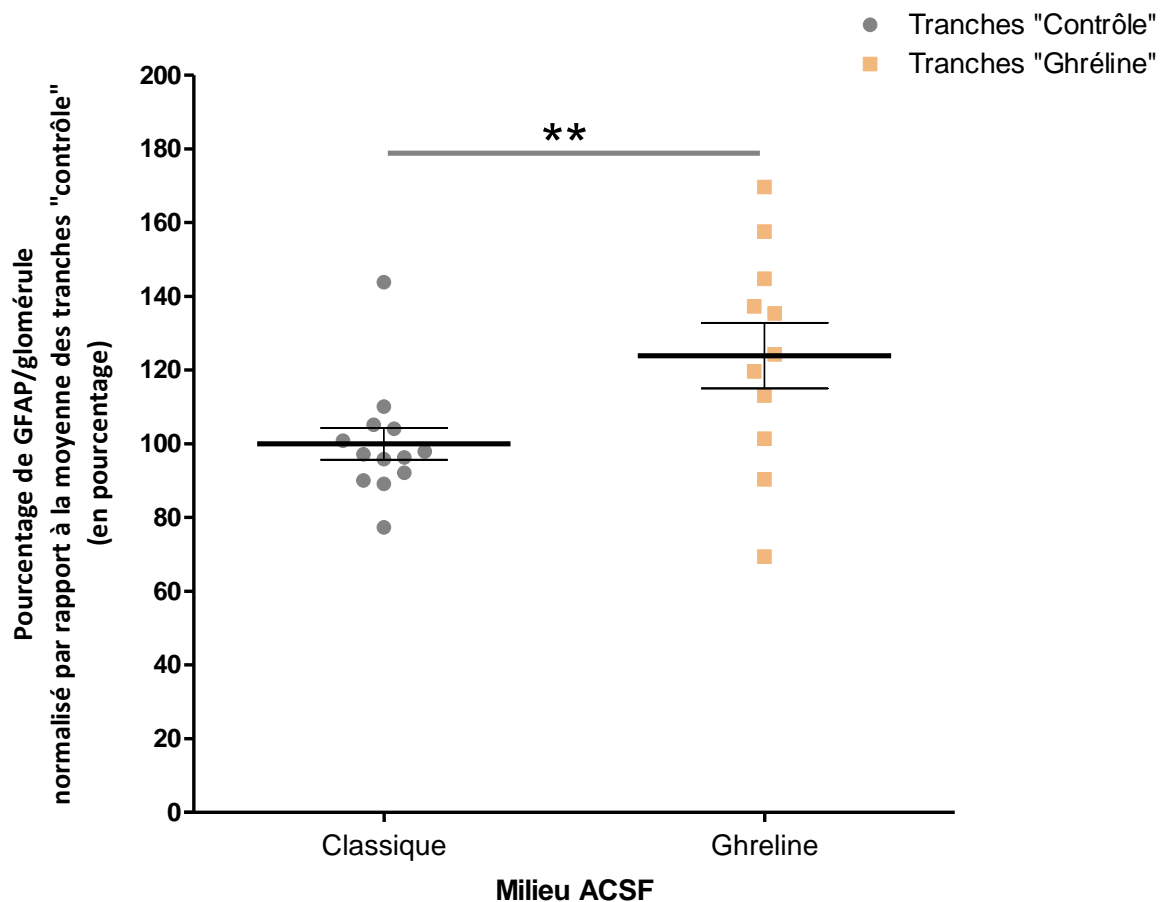


Figure 71: Effet de la ghréline (peptide oréxigène) sur le déploiement astrocytaire dans les glomérules de tranches de BO maintenues en survie

L'aire marquée pour la GFAP, exprimée en pourcentage de l'aire totale de chaque glomérule, mesure le niveau du déploiement astrocytaire dans les glomérules bulbaires. Les marquages immuno-histochimiques ont été réalisés sur des tranches (250 μ m) de bulbes olfactifs maintenues en survie dans un milieu ACSF classique: tranches « contrôle » ou additionné de ghréline (30nM): tranches « ghréline ».

Le résultat est normalisé par rapport à la moyenne des tranches « contrôle » et exprimé en pourcentage. Les données représentent la moyenne \pm S.E.M. des mesures réalisées sur 3 à 4 glomérules/tranche pour n= 11 à 13 tranches par condition (n= 2 rats). Elles sont comparées par un test de permutation (5000 permutations - Logiciel R) avec une correction de « Bonferroni » : **p \leq 0.01.

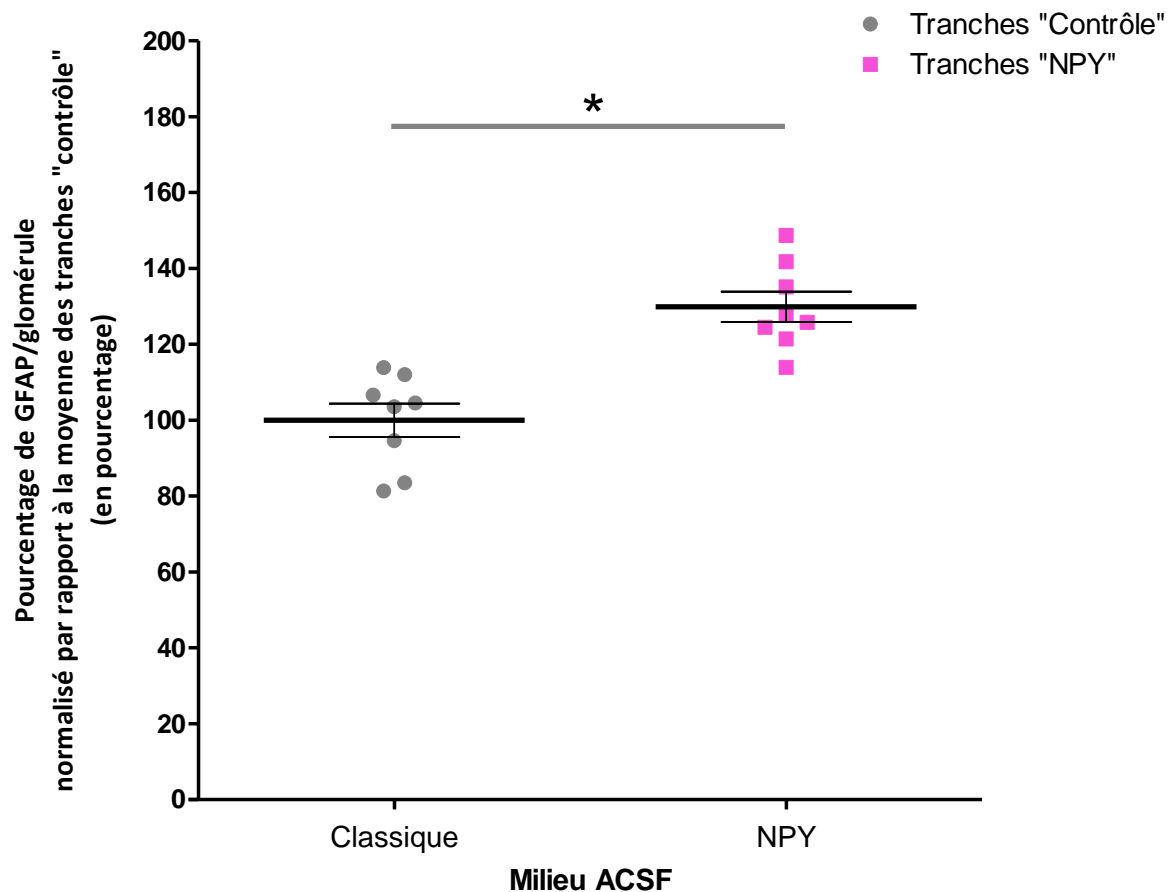


Figure 72: Effet du NPY (Neuropeptide oréxigène) sur le déploiement astrocytaire dans les glomérules de tranches de BO maintenues en survie

L'aire marquée pour la GFAP, exprimée en pourcentage de l'aire totale de chaque glomérule, mesure le niveau du déploiement astrocytaire dans les glomérules bulbaires. Les marquages immuno-histochimiques ont été réalisés sur des tranches (250 μ m) de bulbes olfactifs maintenues en survie dans un milieu ACSF classique: tranches « contrôle » ou additionné de NPY (1 μ M): tranches « NPY ».

Le résultat est normalisé par rapport à la moyenne des tranches « contrôle » et exprimé en pourcentage. Les données représentent la moyenne \pm S.E.M. des mesures réalisées sur 3 à 4 glomérules/tranche pour n= 8 tranches par condition (n= 2 rats). Elles sont comparées par un test de permutation (5000 permutations - Logiciel R) avec une correction de « Bonferroni » : *p \leq 0.05.

2. Impact des peptides anorexigènes sur le déploiement des astrocytes glomérulaires du bulbe olfactif

a. Impact du PYY3-36 sur le déploiement des astrocytes glomérulaires du bulbe olfactif

Le résultat de l'analyse de la GFAP au sein des glomérules bulbaires des tranches « PYY3-36 » (100nM) et « contrôle » est présenté dans la figure 73.

Comparativement aux tranches « contrôle », les tranches « PYY3-36 » présentent une diminution significative de 18.21% du marquage de la GFAP au sein des glomérules ($p < 0.05$). Ainsi, de même que l'injection i.p. de PYY3-36 chez le rat à jeun, l'application directe du PYY3-36 sur des tranches de BO entraîne une rétraction des prolongements astrocytaires glomérulaires.

b. Impact de la leptine sur le déploiement des astrocytes glomérulaires du bulbe olfactif

Le résultat de l'analyse de la GFAP au sein des glomérules bulbaires des tranches « leptine » (100nM) et « contrôle » est présenté dans la figure 74.

Nous n'observons pas de différence de pourcentage de marquage GFAP au sein des glomérules entre les tranches « leptine » (100nM) et les tranches « contrôle ». Par conséquent, la leptine, injectée en i.p. (*in vivo*) ou appliquée directement sur tranche (*ex vivo*), ne semble pas avoir d'effet sur la morphologie des astrocytes glomérulaires du BO, chez le rat.

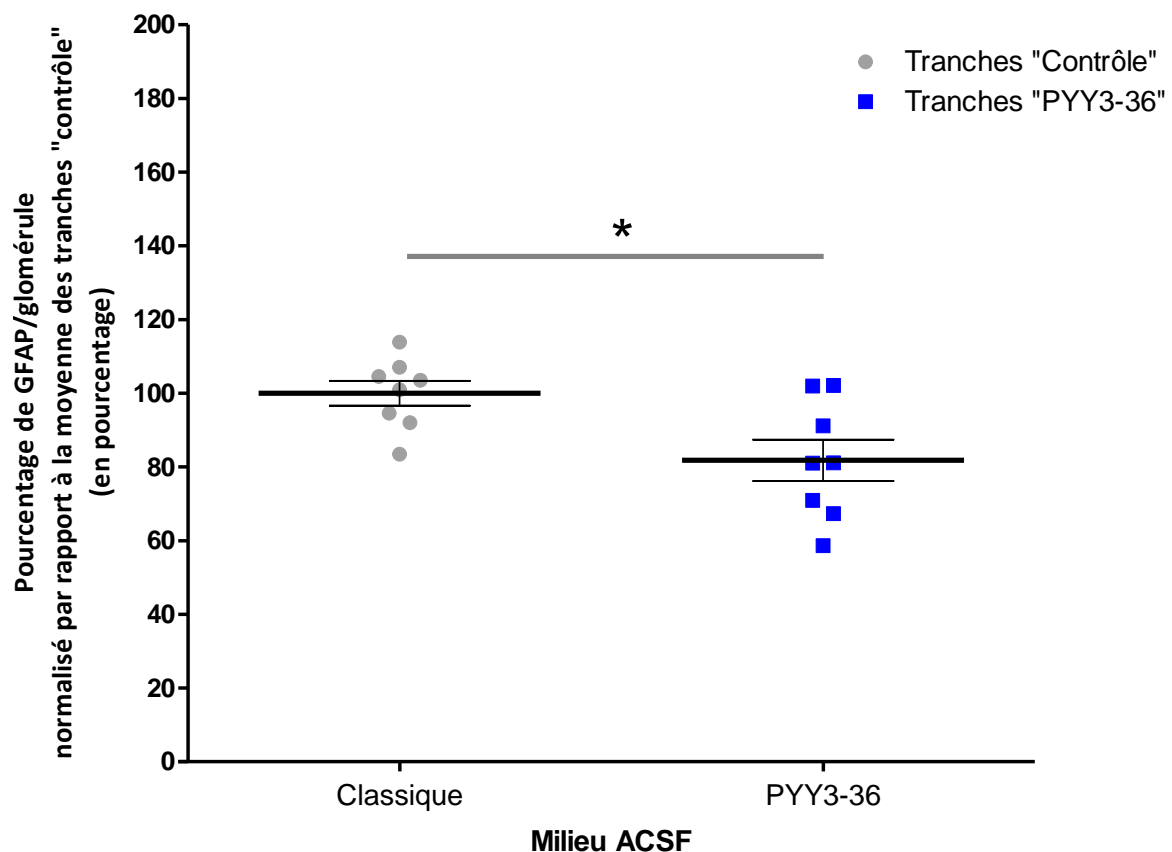


Figure 73: Effet du PYY3-36 (peptide anorexigène) sur le déploiement astrocytaire dans les glomérules de tranches de BO maintenues en survie

L'aire marquée pour la GFAP, exprimée en pourcentage de l'aire totale de chaque glomérule, mesure le niveau du déploiement astrocytaire dans les glomérules bulbaires. Les marquages immuno-histochimiques ont été réalisés sur des tranches (250µm) de bulbes olfactifs maintenues en survie dans un milieu ACSF classique: tranches « contrôle » ou additionné de PYY3-36 (100nM): tranches « PYY3-36 ».

Le résultat est normalisé par rapport à la moyenne des tranches « contrôle » et exprimé en pourcentage. Les données représentent la moyenne ± S.E.M. des mesures réalisées sur 3 à 4 glomérules/tranche pour n= 8 tranches par condition (n= 2 rats). Elles sont comparées par un test de permutation (5000 permutations - Logiciel R) avec une correction de « Bonferroni » : *p≤0.05.

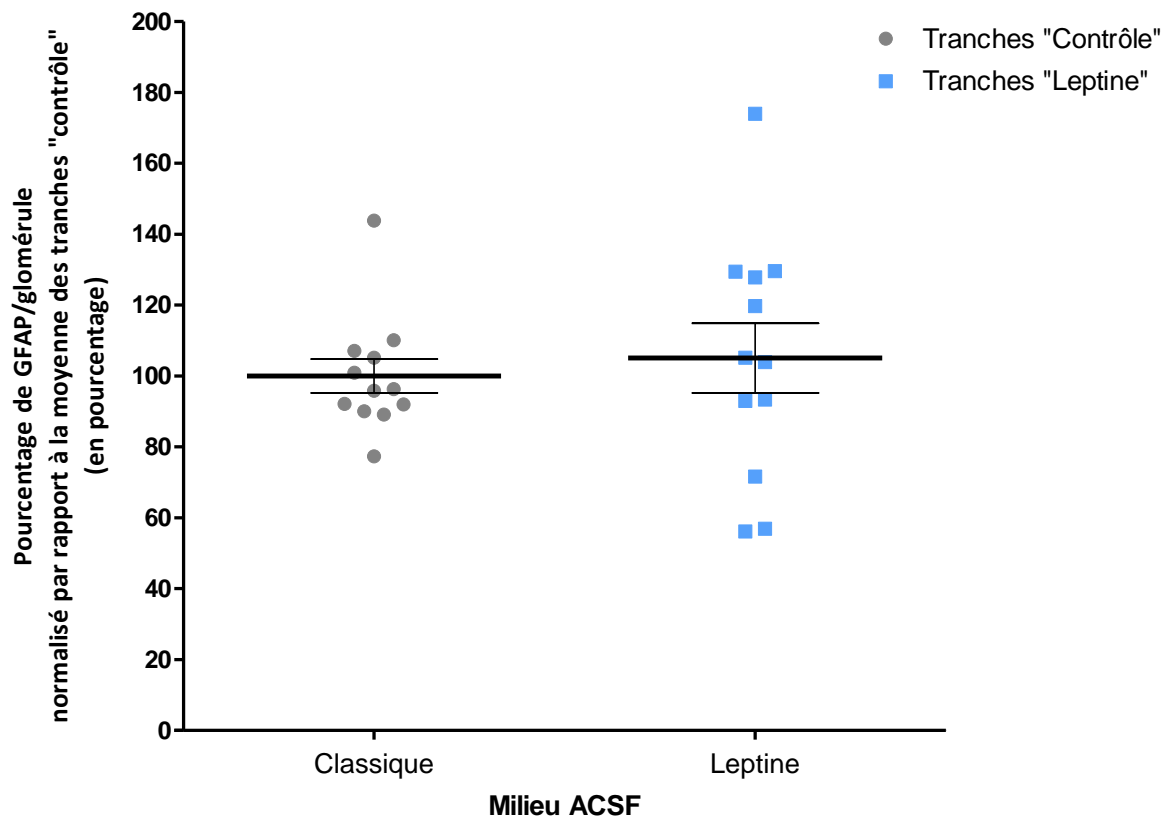


Figure 74: Effet de la leptine (peptide anorexigène) sur le déploiement astrocytaire dans les glomérules de tranches de BO maintenues en survie

L'aire marquée pour la GFAP, exprimée en pourcentage de l'aire totale de chaque glomérule, mesure le niveau du déploiement astrocytaire dans les glomérules bulbaires. Les marquages immuno-histochimiques ont été réalisés sur des tranches (250µm) de bulbes olfactifs maintenues en survie dans un milieu ACSF classique: tranches « contrôle » ou additionné de leptine (100nM): tranches « Leptine ».

Le résultat est normalisé par rapport à la moyenne des tranches « contrôle » et exprimé en pourcentage. Les données représentent la moyenne ± S.E.M. des mesures réalisées sur 3 à 4 glomérules/tranche pour n= 12 tranches par condition (n= 2 rats). Elles sont comparées par un test de permutation (5000 permutations - Logiciel R) avec une correction de "Bonferroni" : *p≤0.05.

Résumé : Etude du rôle des variations glycémiques et des peptides impliqués dans la régulation de la prise alimentaire dans le déploiement des astrocytes glomérulaires

Nos résultats montrent une variation du déploiement astrocytaire au sein des glomérules bulbaires en fonction du statut nutritionnel des rats. Les astrocytes présentent un déploiement plus important en situation de jeûne comparativement à la situation de satiété (rats nourris). Nous avons donc cherché à déterminer si ces observations dépendent des variations glycémiques et/ou des peptides impliqués dans la régulation de la prise alimentaire.

Nous avons mis en évidence que l'application directe de ghréline et de NPY sur des tranches de BO entraîne une augmentation du déploiement astrocytaire dans les glomérules. Ces deux (neuro)peptides orexigènes, libérés avant le repas, apparaissent être des effecteurs de ce déploiement astrocytaire, observé chez les rats à jeun 17h. Néanmoins, la ghréline, injectée chez des rats nourris, bien que stimulant la prise alimentaire, n'a pas eu d'action sur le déploiement astrocytaire, mais ceci résulte probablement du fait de son implication dans de multiples boucles de régulations complexes de la prise alimentaire.

A l'inverse, l'injection de PYY3-36 ou de glucose chez des rats à jeun 17h, induit une rétraction des prolongements astrocytaires normalement déployés en situations de jeûne, mimant ainsi un état de satiété. La libération du peptide anorexigène PYY3-36 et l'augmentation de la glycémie en situation de satiété apparaissent être des effecteurs de la rétraction astrocytaire observé chez les animaux nourris. En revanche, la leptine, également libérée en situation de satiété, n'a pas eu d'action sur le déploiement astrocytaire *in vivo* comme *ex vivo*.

Le déploiement astrocytaire au sein des glomérules du bulbe olfactif varie en fonction du statut métabolique des rats, et est influencé par des peptides et neuropeptides impliqués dans la régulation de la prise alimentaire (PYY3-36, la ghréline et le NPY) et/ou par les variations de la glycémie. Cette plasticité morphologique astrocytaire au sein du bulbe olfactif, nous ouvre des pistes intéressantes pour comprendre comment l'état métabolique est capable d'influencer notre détection olfactive. Les astrocytes glomérulaires pourraient donc avoir un rôle central dans les mécanismes d'adaptation de la sensibilité olfactive au statut métabolique. Pour avancer sur ces mécanismes nous avons poursuivi notre étude en cherchant à comprendre par quel(s) mode(s) d'action(s) les peptides orexigènes et anorexigènes modulent le déploiement astrocytaire glomérulaire.

V. Etude du mode d'action des peptides (résultats préliminaires)

1. Présence des récepteurs des peptides orexigènes et anorexigènes dans le bulbe olfactif

Nos résultats montrent une modification morphologique des astrocytes glomérulaires en présence de certains peptides orexigènes ou anorexigène (Chapitre III et IV). La plupart des récepteurs à ces peptides sont exprimés dans le BO (Introduction : chapitre II.3.), en revanche leur localisation précise et spécifique sur un ou plusieurs types cellulaires bulbaires (neurones et/ou astrocytes) n'est pas encore bien établie dans la littérature et apparaît difficile à analyser par immunohistochimie (figure 75, 76 et 77). Cela vient du fait de la difficulté d'obtenir des anticorps spécifiques, notamment pour le récepteur à la ghréline, ainsi que de mettre en évidence une co-localisation fiable de ces récepteurs avec les astrocytes.

Néanmoins, l'analyse immunohistochimique du récepteur Y1 du NPY montre une présence diffuse de ce récepteur dans l'ensemble du BO avec une plus forte densité au niveau des glomérules, ainsi qu'une apparente co-localisation avec le marquage GFAP, notamment au niveau glomérulaire (figure 75). Le récepteur Y2 du PYY3-36 est également présent dans l'ensemble des différentes couches du BO, au niveau des corps cellulaires des différents neurones bulbaires mais également au niveau des corps cellulaires des astrocytes (bien visible dans la couche plexiforme externe) (figure 76). Nous avons également marqué le récepteur à la leptine Ob-R, dont le marquage est essentiellement localisé au niveau des capillaires sanguins de la couche glomérulaire et celle de la plexiforme externe, et au niveau des corps cellulaires des cellules mitrales et de quelques cellules juxta-glomérulaires. La co-localisation de ce récepteur avec la GFAP est moins évidente mais n'est pas à exclure (figure 77)

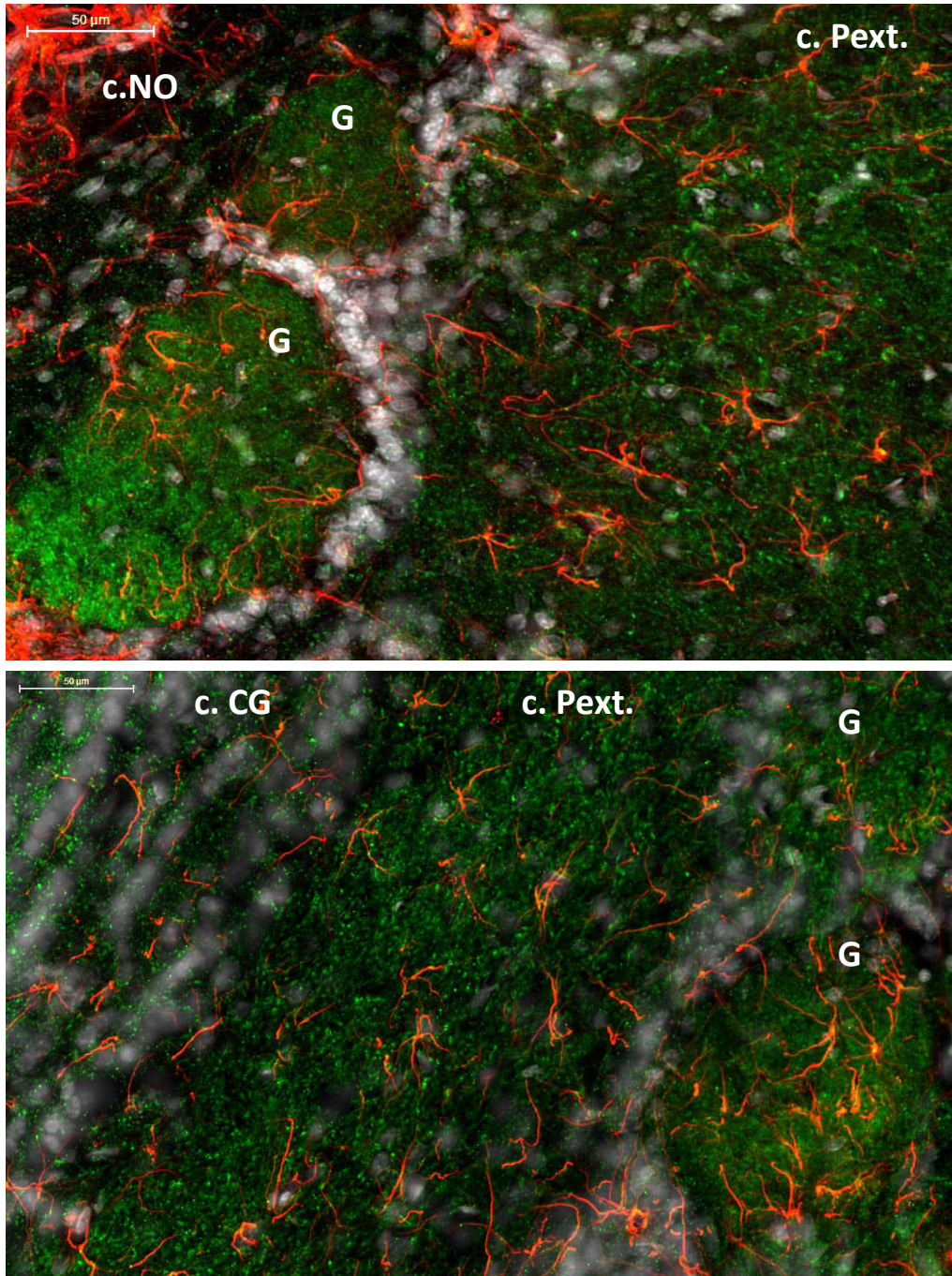


Figure 75: Localisation du récepteur Y1R dans le BO de rat

Marquage immunohistochimique des filaments astrocytaires marqués par la GFAP (rouge), des récepteurs Y1 (Y1R) du NPY (vert) et des noyaux marqués par du Hoechst (gris). On observe une forte densité du Y1R au niveau des glomérules et une co-localisation GFAP et Y1R (jaune) non exclusive. Les photos ont été réalisées à partir du logiciel panoramique viewer à l'objectif 40X après immunohistochimie sur les bulbes olfactifs prélevés au sacrifice des rats (Rat nourri). c.CG: Couche des cellules granulaires; c.NO: Couche des fibres des neurones olfactifs; c.Pext.: Couche plexiforme externe; G: Glomérule.

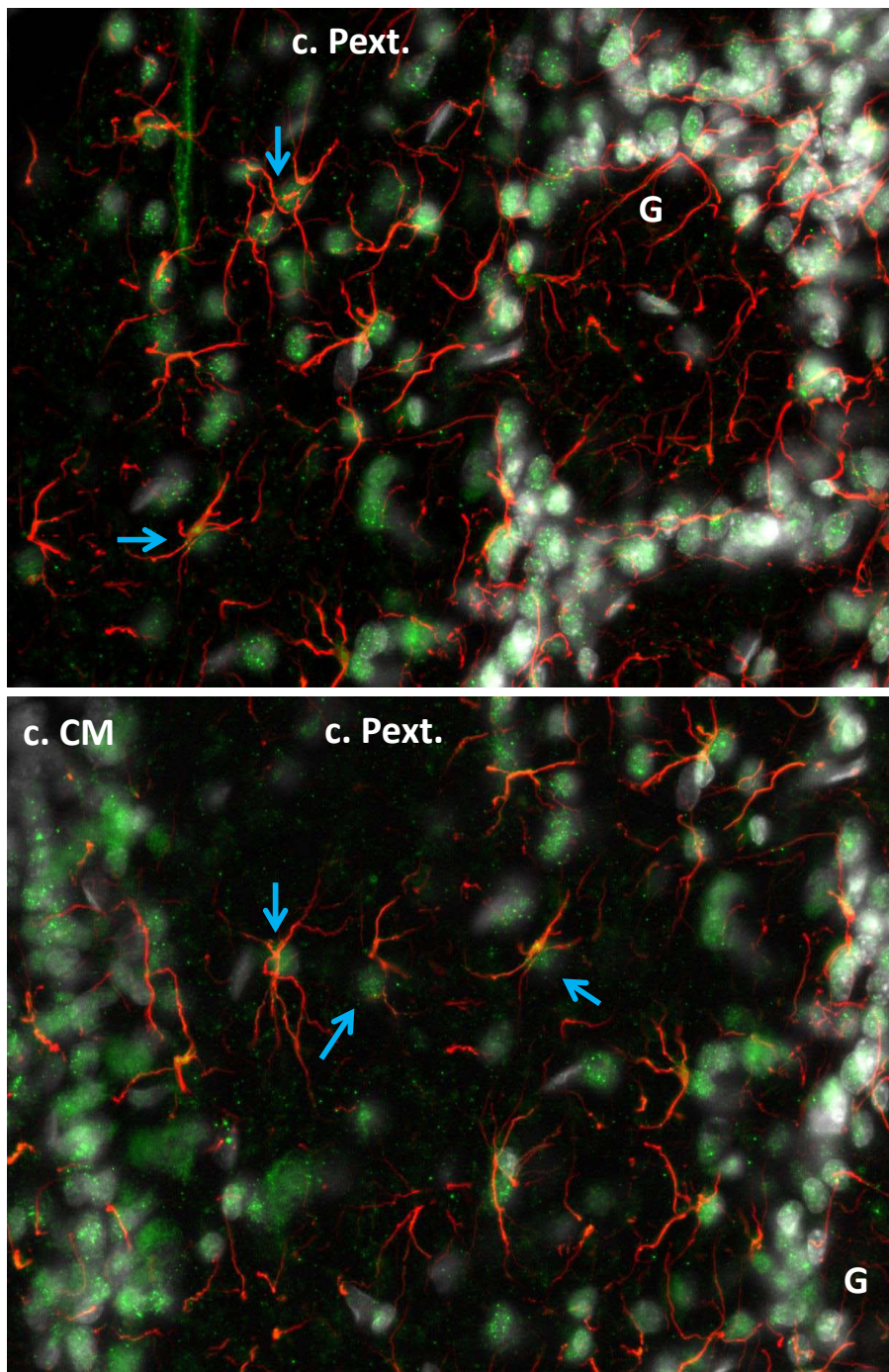


Figure 76: Localisation du récepteur Y2R dans le BO de rat

Marquage immunohistochimique des filaments astrocytaires marqués par la GFAP (rouge), des récepteurs Y2 (Y2R) du PYY3-36 (vert) et des noyaux marqués par du Hoechst (gris). On observe que le marquage Y2R est essentiellement nucléaire quelle que soit sa localisation dans le BO et le type cellulaire (astrocytes et neurones). Les flèches indiquent une co-localisation astrocytes-Y2R. Les photos ont été réalisées à l'objectif 40X à immersion à huile, après immunohistochimie sur les bulbes olfactifs prélevés au sacrifice des rats (Rat nourri). c.CM: Couche des cellules mitrales; c.Pext.: Couche plexiforme externe; G: Glomérule.

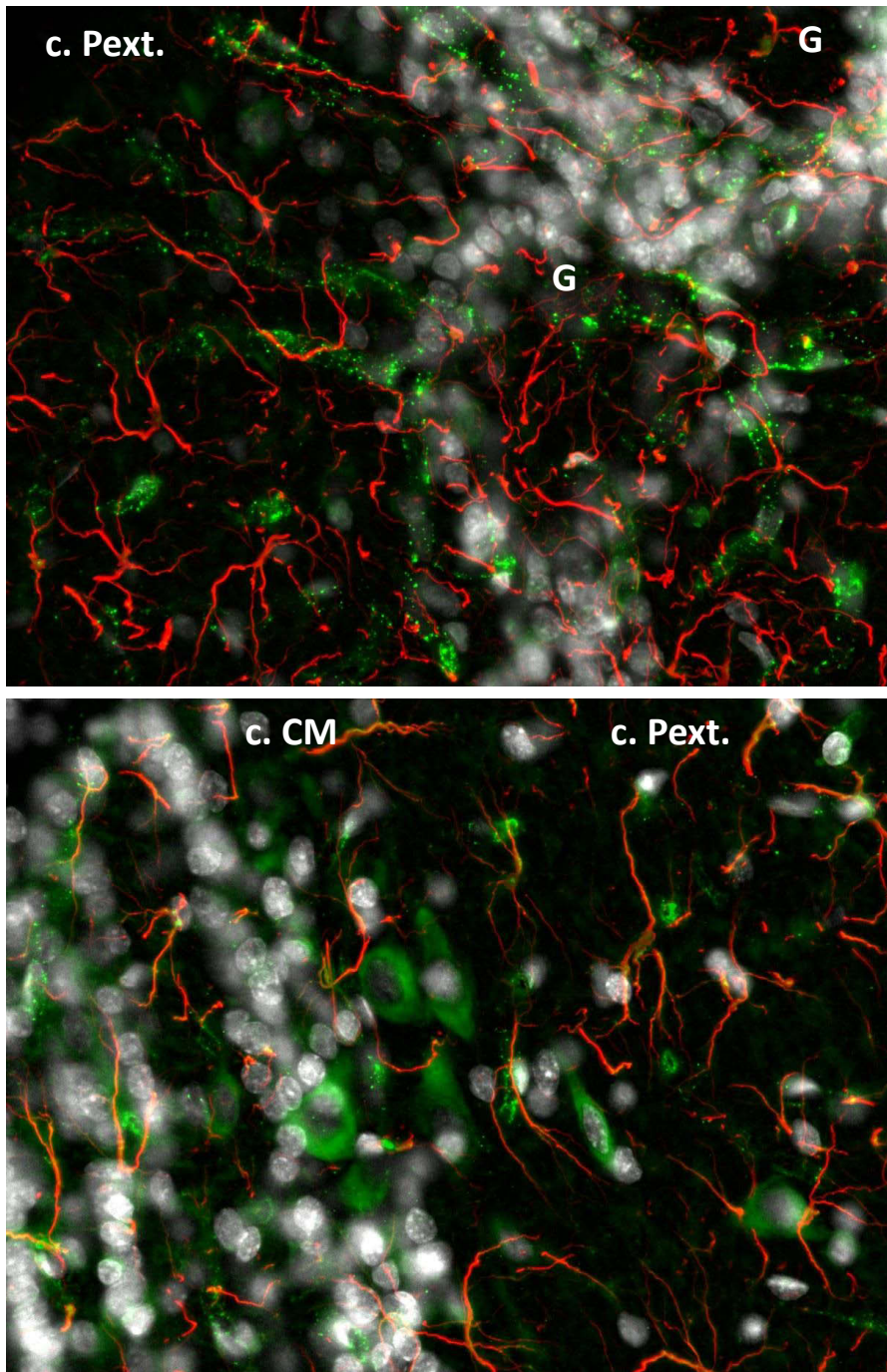


Figure 77: Localisation du récepteur ObR dans le BO de rat:

Marquage immunohistochimique des filaments astrocytaires marqués par la GFAP (rouge), des récepteurs à la leptine marqués pour les isoformes courts et longs (ObR a et b) (vert) et des noyaux marqués par du Hoechst (gris). On observe que le marquage ObR est essentiellement localisé au niveau des capillaires sanguins bulbaires et au niveau nucléaire dans les cellules mitrales et quelques neurones péri-glomérulaires. La co-localisation astrocyte-ObR n'a pas été visualisée mais n'est pas à exclure. Les photos ont été réalisées à l'objectif 40X à immersion à huile, après immunohistochimie sur les bulbes olfactifs prélevés au sacrifice des rats (Rat nourri). c.CM: Couche des cellules mitrales; c.Pext.: Couche plexiforme externe; G: Glomérule.

2. Etude de l'impact des variations d'activité synaptique sur le déploiement des astrocytes glomérulaires – Ex vivo

L'activité neuronale des circuits olfactifs du BO est sensible aux changements métaboliques de l'organisme. Augmentée en état de jeûne (Prud'homme et al., 2009), elle pourrait être impliquée dans les mécanismes qui déterminent le déploiement des astrocytes glomérulaires en fonction du statut nutritionnel des rats.

a. Effet d'un inhibiteur de l'activité synaptique (TTX)

Dans le but de déterminer si ces peptides modifient la morphologie des astrocytes glomérulaires par une action directe via l'activation de récepteurs astrocytaires et/ou indirecte via une activation neuronale, nous avons utilisé le modèle *ex vivo* de tranches de BO maintenues en survie. Les tranches ont été incubées pendant 1 heure en présence de NPY (neuropeptide augmentant le déploiement astrocytaire glomérulaire *ex vivo* – 1 μ M) et/ou de tétródotoxine (TTX – 10 μ M) (Tranches « NPY », « TTX » ou « NPY+TTX »). La TTX est une toxine qui bloque les canaux sodiques voltage-dépendants des neurones, inhibant ainsi leur activité. Le déploiement astrocytaire glomérulaire de ces tranches est comparé à celui de tranches « contrôle » (incubées dans un milieu ACSF standard)

Les résultats ont été obtenus à partir de 3 à 4 tranches par groupe, issues d'un seul rat, ce qui les rend préliminaires. La comparaison statistique montre des différences significatives entre les groupes si l'on prend en compte les valeurs individuelles par glomérule (Figure 78 A) et non par tranche (figure 78 B). Sur cette base, le traitement avec le NPY induit, comme précédemment observé (Figure 72), une augmentation du déploiement astrocytaire (+ 32%, $p < 0.01$), qui est abolie en présence de TTX. Le traitement avec la TTX seule est sans effet.

Ces résultats devront être confirmés en répétant l'expérience sur un plus grand nombre de tranches. Ils indiquent que l'induction du déploiement astrocytaire par le NPY nécessite une activité synaptique, ce qui suggère que le déploiement astrocytaire observé est une réponse à une stimulation neuronale par le NPY.

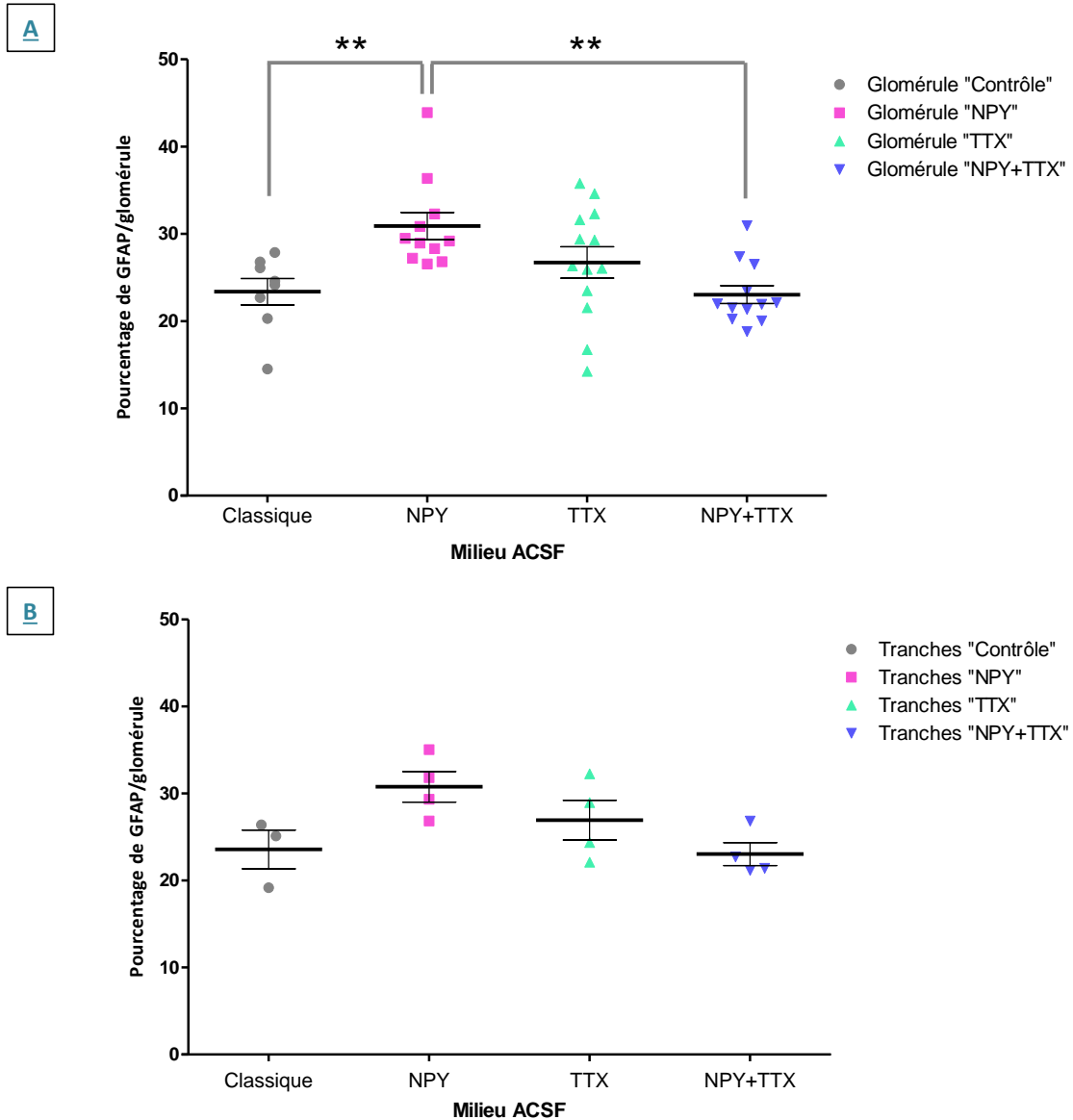


Figure 78: Effet d'une inhibition d'activité neuronale (TTX) sur le déploiement astrocytaire glomérulaire induit par l'action du NPY sur des tranches de BO maintenues en survie

Le TTX inhibe l'activité neuronale par blocage des canaux sodique. L'aire marquée pour la GFAP, exprimée en pourcentage de l'aire totale de chaque glomérule, mesure le niveau du déploiement astrocytaire dans les glomérules bulbaires. Les marquages immuno-histochimiques ont été réalisés sur des tranches (250µm) de bulbes olfactifs maintenues en survie dans un milieu ACSF classique: « contrôle » ou additionné de NPY (1µM) et/ou de TTX (10µM): « NPY », « TTX » ou « NPY+TTX ».

Les données représentent la moyenne ± S.E.M. des mesures réalisées sur 3 glomérules/tranche pour n= 3 à 4 tranches par condition (n= 1 rats). Pour chaque condition, les données représentent: **Figure A** = la valeur par **GLOMERULE** du pourcentage de GFAP/glomérule; **Figure B** = la moyenne par **TRANCHE** du pourcentage de GFAP/glomérule

Les données sont comparées par un test de permutation (5000 permutations - Logiciel R) avec une correction de « Bonferroni » : **p≤0.01.

b. Impact du tACPD sur le déploiement des astrocytes glomérulaires du bulbe olfactif

Sur la base de ce résultat préliminaire suggérant que l'action des peptides de la prise alimentaire sur le déploiement astrocytaire glomérulaire passe par une activation synaptique, nous avons cherché à savoir si le glutamate, principal neurotransmetteur exciteur dans les glomérules, pouvait jouer un rôle et induire le déploiement astrocytaire. Pour ce faire, nous avons incubé pendant 1 h des tranches de BO maintenues en survie dans un milieu ACSF additionné de tACPD (20 μ M) (tranches « tACPD »). Le tACPD est un agoniste sélectif des récepteurs métabotropiques au glutamate de type I présents sur les astrocytes. Il permet de mimer (partiellement) une activité neuronale glutamatergique et d'induire une augmentation transitoire de Ca²⁺ intracellulaire dans les astrocytes. Le déploiement astrocytaire glomérulaire de ces tranches est comparé à celui de tranches « contrôle » (milieu ACSF sans tACPD). Le résultat de l'analyse de la GFAP au sein des glomérules bulbaires est présenté dans la figure 79.

Nous n'observons pas de différence significative du pourcentage de marquage GFAP au sein des glomérules entre les tranches « tACPD » et les tranches « contrôle », et ceci quelle que soit la comparaison statistique entre les deux groupes (valeurs individuelles par glomérule (Figure 79 A) ou par tranche (figure 79 B)).

Sur cette base (préliminaire) le tACPD ne semble pas avoir d'effet sur la morphologie des astrocytes glomérulaires du BO. Par conséquent, l'augmentation du déploiement astrocytaire par l'activité synaptique ne semble pas passer par une activation des récepteurs métabotropiques au glutamate de type I. Ces résultats devront être confirmés en répétant l'expérience sur un plus grand nombre de tranches.

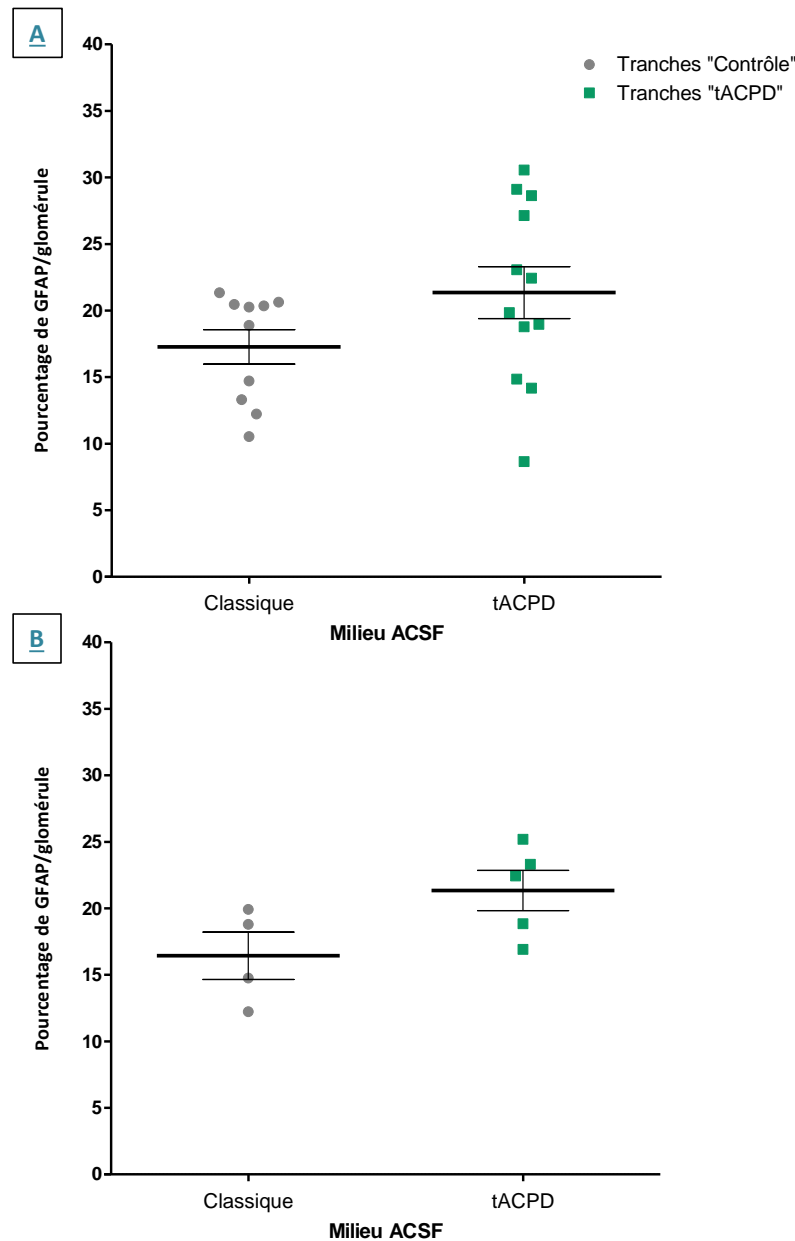


Figure 79: Effet du tACPD sur le déploiement astrocytaire dans les glomérules de tranches de BO maintenues en survie

Le tACPD est un agoniste sélectif des récepteurs métabotropiques au glutamate de type I présents sur les astrocytes. L'aire marquée pour la GFAP, exprimée en pourcentage de l'aire totale de chaque glomérule, mesure le niveau du déploiement astrocytaire dans les glomérules bulbaire. Les marquages immunohistochimiques ont été réalisés sur des tranches de bulbes olfactifs maintenues en survie dans un milieu ACSF classique: tranches « contrôle » ou additionné de tACPD (20 μ M): tranches « tACPD ».

Les données représentent la moyenne \pm S.E.M. des mesures réalisées sur 3 à 4 glomérules/tranche pour n= 4 à 5 tranches par condition (n= 1 rats). Pour chaque condition, les données représentent: Figure A = la valeur par **GLOMERULE** du pourcentage de GFAP/glomérule; Figure B = la moyenne par **TRANCHE** du pourcentage de GFAP/glomérule.

Elles sont comparées par un test de permutation (5000 permutations - Logiciel R) avec une correction de « Bonferroni » : *p \leq 0.05.

VI. Etude de la signalisation calcique des astrocytes glomérulaires du bulbe olfactif (Résultats préliminaires)

Les astrocytes, partenaires essentiels des synapses glutamatergiques, sont considérés comme des méta-régulateurs de la neurotransmission dans le SNC, notamment en coordonnant des réseaux neuronaux en réponse à des stimuli hormonaux et environnementaux. Cette fonction repose en grande partie sur la signalisation calcique astrocytaire, induite par l'activation des récepteurs astrocytaires à différents neurotransmetteurs (glutamate, GABA, acétylcholine, endocannabinoïdes ou encore ATP), capable de se propager dans l'ensemble du réseau astrocytaire. Nos résultats mettent en évidence une plasticité morphologique des astrocytes dans les glomérules bulbaires en fonction de l'état métabolique des rats, entraînant très probablement dans ces structures des modifications de déploiement astrocytaire capables d'impacter le maintien de l'homéostasie extracellulaire et la transmission du signal olfactif. Afin d'aborder les conséquences fonctionnelles d'une telle plasticité morphologique, nous avons développé des approches d'imagerie calcique pour étudier la signalisation calcique des astrocytes de la couche glomérulaire dans des tranches de BO de rat.

1. Utilisation de la sulforhodamine G pour identifier les astrocytes bulbaires

Dans le but d'analyser uniquement la réponse calcique astrocytaire, nous avons besoin de pouvoir visualiser et identifier spécifiquement les astrocytes parmi les nombreuses cellules visibles en imagerie dans la région glomérulaire d'une tranche de BO de rat. Nous avons pour cela eu recours à un colorant fluorescent, la sulforhodamineG (sulfoG), qui est capté spécifiquement par les astrocytes et permet d'analyser leur réponse calcique en les différenciant des neurones (Appaix et al., 2012; Nimmerjahn and Helmchen, 2012; Nimmerjahn et al., 2004).

Nous avons testé et comparé deux méthodes d'application de la sulfoG : l'injection dans la veine caudale des rats (27 mM), 1h30 avant le début des expérimentations *ex vivo*, ou l'application directe (1 μ M) pendant 45 minutes sur les tranches de BO maintenues en survie (figure 80).

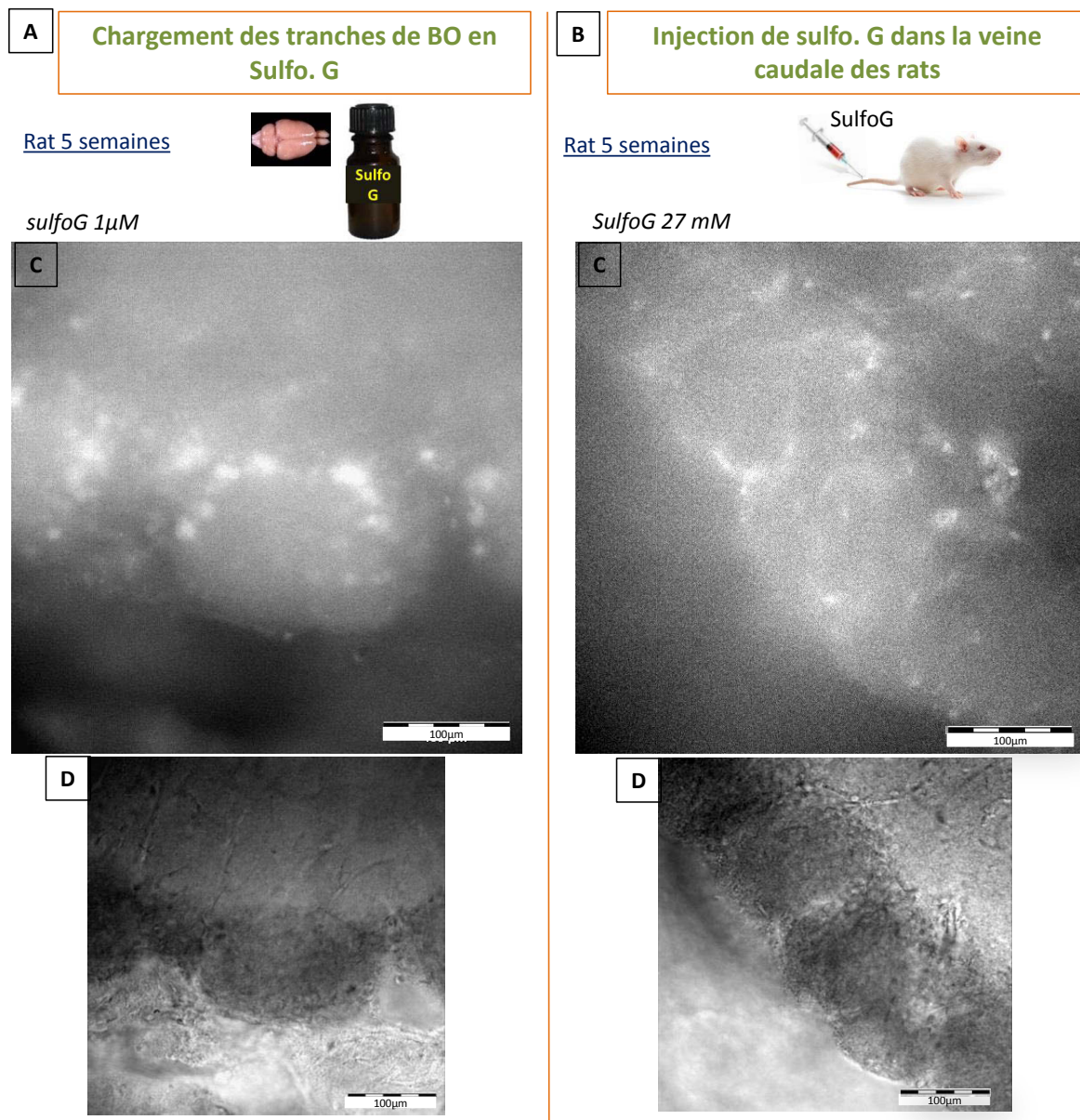


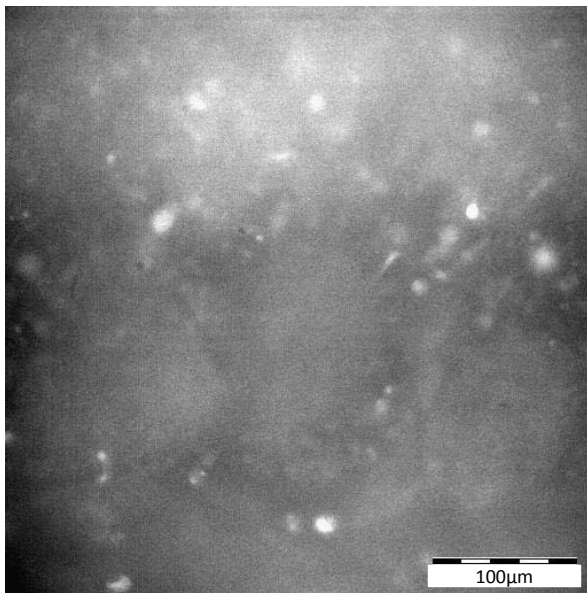
Figure 80: Mise au point des techniques d'imagerie calcique dans le BO: Comparaison du mode d'application de la sulforhodamine G (sulfoG) pour le marquage des astrocytes

La sulfoG est un colorant fluorescent spécifiquement capté par les astrocytes, et visualisée à 548nm. Les photos de tranches de BO de rats âgés de 5 semaines sont prises au niveau de la couche glomérulaire en fluorescence (sulfoG; (C)) puis en DIC/IR (D). Les photos ont été réalisées à partir du logiciel XcellenceRT à l'objectif 40X.

Deux méthodes d'application de la sulfoG ont été testées:

- A: Incubation pendant 45 minutes sur des tranches de BO de rat maintenues en survies (sulfoG: 1 μ M).
- B: Injection dans la veine caudale des rats 1h30 avant le début des expérimentations (sulfoG: 27 mM).

Sulforhodamine G 1 μ M



Sulforhodamine G 5 μ M

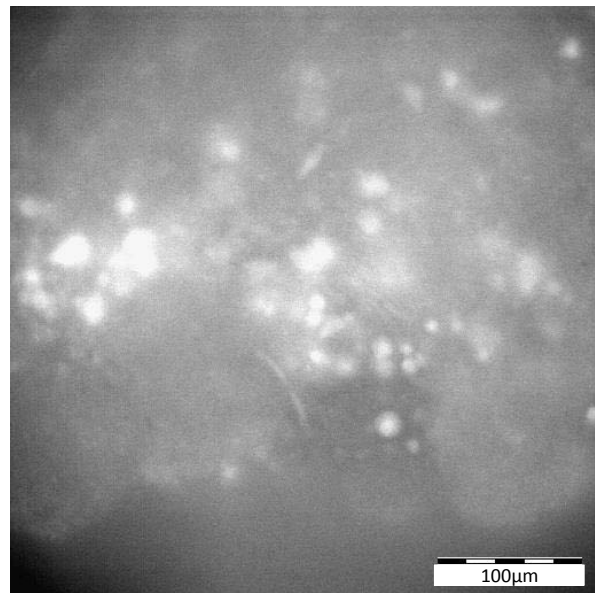


Figure 81: Mise au point des techniques d'imagerie calcique dans le BO: Comparaison de deux concentrations de sulfoG (1 μ M vs 5 μ M) pour la méthode d'application direct sur tranche de BO

La sulfoG est un colorant fluorescent spécifiquement capté par les astrocytes, et visualisée à 548nm.

Les photos de tranches de BO de rats âgés de 5 semaines sont prises au niveau de la couche glomérulaire en fluorescence à la sulfoG . Elles ont été réalisées à partir du logiciel XcellenceRT à l'objectif 40X.

Contrairement à ce qui était rapporté dans d'autres régions du cerveau, nous avons observé, pour les deux méthodes d'application, une coloration diffuse et peu intense des astrocytes du BO, difficilement discernable du bruit de fond. Pour les injections dans la veine caudale, il semblerait que la sulfoG demeure accumulée dans la microvascularisation du BO, dense au niveau des glomérules, gênant la visualisation et localisation des astrocytes. Cette méthode étant stressante pour les animaux, et n'apportant pas de meilleurs résultats, nous avons choisi de poursuivre nos mises aux points avec la méthode d'application directe de la sulfoG sur les tranches de BO.

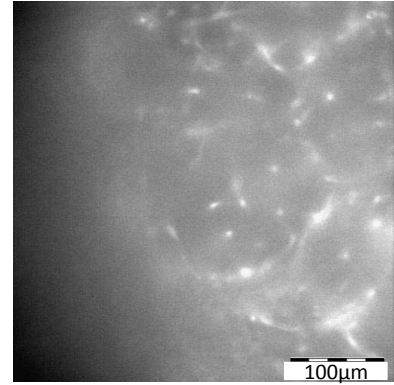
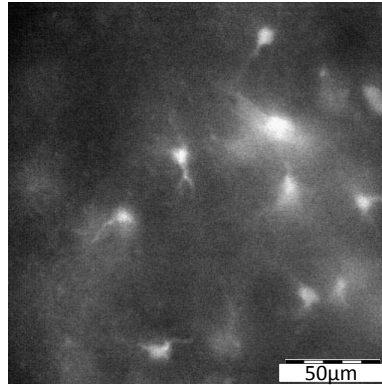
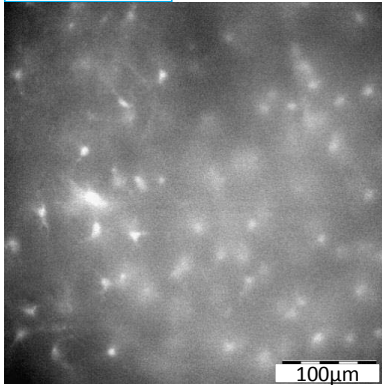
Pour l'application direct sur les tranches, deux concentrations de sulfoG ont été testées afin d'optimiser le chargement des astrocytes avec ce colorant: 1 μ M et 5 μ M (Figure 81). La concentration de 5 μ M de sulfoG n'apporte pas de meilleur marquage des astrocytes, mais entraine une plus grande fixation non-spécifique du colorant hors des cellules, accentuant le bruit de fond. Par conséquent, la concentration de 1 μ M a été retenue pour la suite des expérimentations.

2. Impact de l'âge des rats sur le chargement en sulforhodamine G des astrocytes du bulbe olfactif

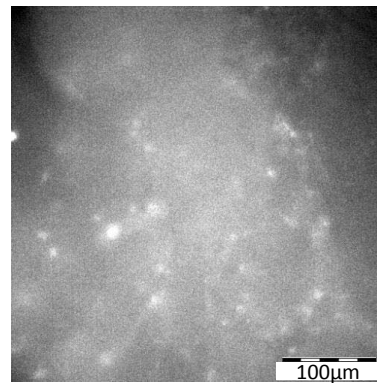
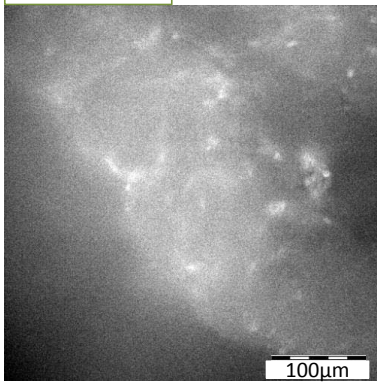
Devant l'efficacité relative de la sulforhodamine dans le BO, nous avons testé l'effet de l'âge des animaux sur cette approche. L'âge des animaux semble en effet impacter la qualité du chargement en sulfoG des astrocytes (figure 82) ; plus l'animal est jeune (17 jours), meilleure est la visualisation des astrocytes, dont le marquage est moins diffus et plus précis. Nous avons d'ailleurs observé que la qualité du chargement des astrocytes en sonde calcique est également meilleure chez des animaux plus jeunes. Cependant, le réseau astrocytaire évolue beaucoup et assez tardivement au cours du développement cérébrale, et ne devient mature qu'à partir de 4 à 5 semaines post-natale chez le rat (Thèse Barbara Grintal 2009; Bushong et al., 2004; Catalani et al., 2002). Notre étude nécessitant un réseau astrocytaire mature, fonctionnel, et stable, nous avons dû optimiser les conditions expérimentales pour l'imagerie calcique sur des tranches de BO de rats âgés de 5 semaines.

Il est également intéressant de remarquer que sur une même tranche, le marquage des astrocytes par la sulfoG apparaît bien plus fort et efficace au niveau du cortex que dans le BO, similaire à ce qui est rapporté dans la littérature (validant par la même les conditions de nos expériences) (Figure 83). Malheureusement pour notre étude, il apparaît que les astrocytes du BO présentent des propriétés particulières, différentes de ceux du cortex en termes de capacité à capter et/ou à conserver un marqueur fluorescent comme la sulforhodamine.

Rat 17 jours



Rat 35 jours



Rat 46 jours

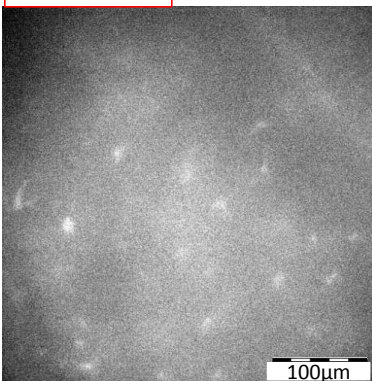


Figure 82: Mise au point des techniques d'imagerie calcique dans le BO: Comparaison de l'âge des rats pour l'optimisation du chargement des astrocytes en sulfoG

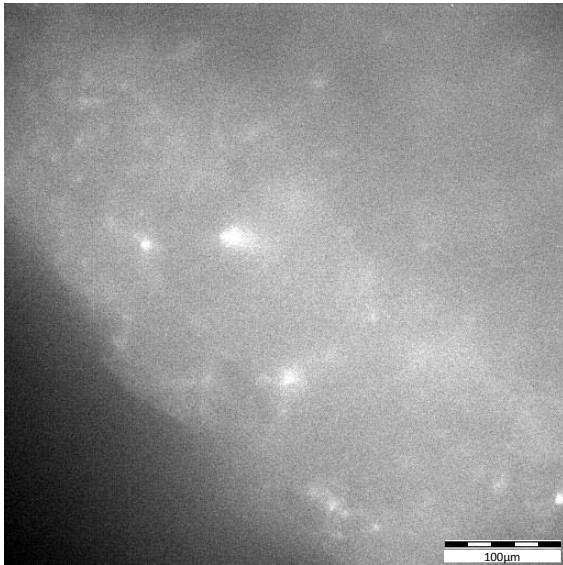
La sulfoG est un colorant fluorescent spécifiquement capté par les astrocytes, et visualisée à 548nm.

Les tranches de BO ont été réalisées à partir de rats âgés de 17 jours, 35 jours ou 46 jours.

Les photos sont prises au niveau de la couche glomérulaire en fluorescence à la sulfoG. Elles ont été réalisées à partir du logiciel XcellenceRT à l'objectif 40X ou 80X.

Rat 5 semaines

Couche glomérulaire du
BULBE OLFACTIF



CORTEX

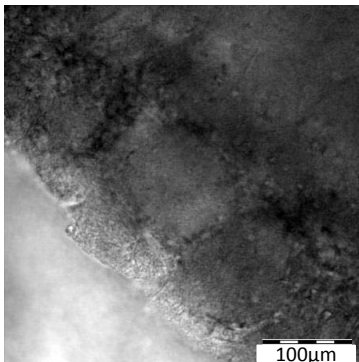
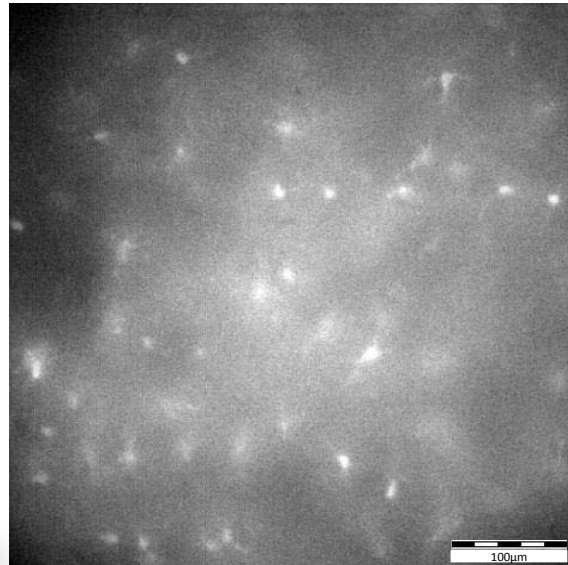


Figure 83: Mise au point des techniques d'imagerie calcique dans le BO: Comparaison entre le BO et le cortex, du chargement des astrocytes en sulfoG

La sulfoG est un colorant fluorescent spécifiquement capté par les astrocytes, et visualisée à 548nm.

Les photos des tranches de rats âgés de 5 semaines sont prises soit au niveau de la couche glomérulaire dans le BO en fluorescence à la sulfoG puis en contraste de phase (photos de gauche), soit au niveau du cortex cérébral (photo de droite). Les photos ont été réalisées à partir du logiciel XcellenceRT à l'objectif 40X.

3. Comparaison de différentes sondes calciques pour les études d'imagerie calcique au sein du bulbe olfactif

En parallèle de nos tentatives pour marquer les astrocytes glomérulaires avec la sulfoG, nous avons recherché une sonde calcique fluorescente adaptée à nos besoins. Nous avons testés pour cette étude deux sondes calciques différentes, le FURA-2 (6 μ M) et l'OGB1 (8 μ M), utilisées avec succès au laboratoire, sur des cellules non-neuronales, dans des conditions similaires, dans d'autres régions (MO, cortex, hippocampe) (figure 84).

Nos observations indiquaient que les longueurs d'onde d'émission de l'OGB1 ($\lambda_{\text{émission}}$: 523nm) et de la sulfoG ($\lambda_{\text{émission}}$: 548nm) sont trop proches pour pouvoir visualiser leur fluorescence distinctement. Par conséquent, la sonde calcique FURA-2 ($\lambda_{\text{émission}}$: 510nm) semblait être la plus adaptée à nos besoins.

Après de nombreuses tentatives de stimulation des tranches de BO à l'ATP (10⁻⁴M) ou au tACPD (20 μ M), nous n'avons pas réussi à obtenir de réponse calcique astrocytaire franche au niveau de la couche glomérulaire, contrairement à ce que nous avons réussi au niveau du cortex, de l'hippocampe ou de la MO. Cet échec peut résulter du fait que nous n'avons pas réussi à localiser de façon suffisamment précise les astrocytes juxta-glomérulaires marqués à la sulfoG (trop de bruit de fond, fluorescence des cellules péri-glomérulaires voisines) et/ou que ces cellules ne se sont pas chargées correctement avec la sonde calcique contrairement aux astrocytes du cortex.

4. Impact des transporteurs MRP1 sur la pénétration des différents agents pharmacologiques dans les cellules du bulbe olfactif

Les transporteurs MRP (pour *Multidrug Resistance associated Protein*) sont des protéines transmembranaires de la famille des transporteurs ABC (activité ATPasique) qui permettent le transport hors des cellules de molécules lipophiles anioniques. Ces transporteurs jouent un rôle dans la détoxification cellulaire de nombreux composés cytotoxiques exogènes ou endogènes. Il a été montré que ces transporteurs sont particulièrement actifs dans le système olfactif, MO et BO, limitant fortement le chargement par un certain nombre de molécules fluorescentes (Manzini and Schild, 2003; Molinas et al., 2012). Dans le but d'améliorer le chargement des astrocytes bulbaires à la sulfoG et aux sondes calciques, nous avons donc incubé les tranches de BO avec un inhibiteur des transporteurs MRP1: le MK571.

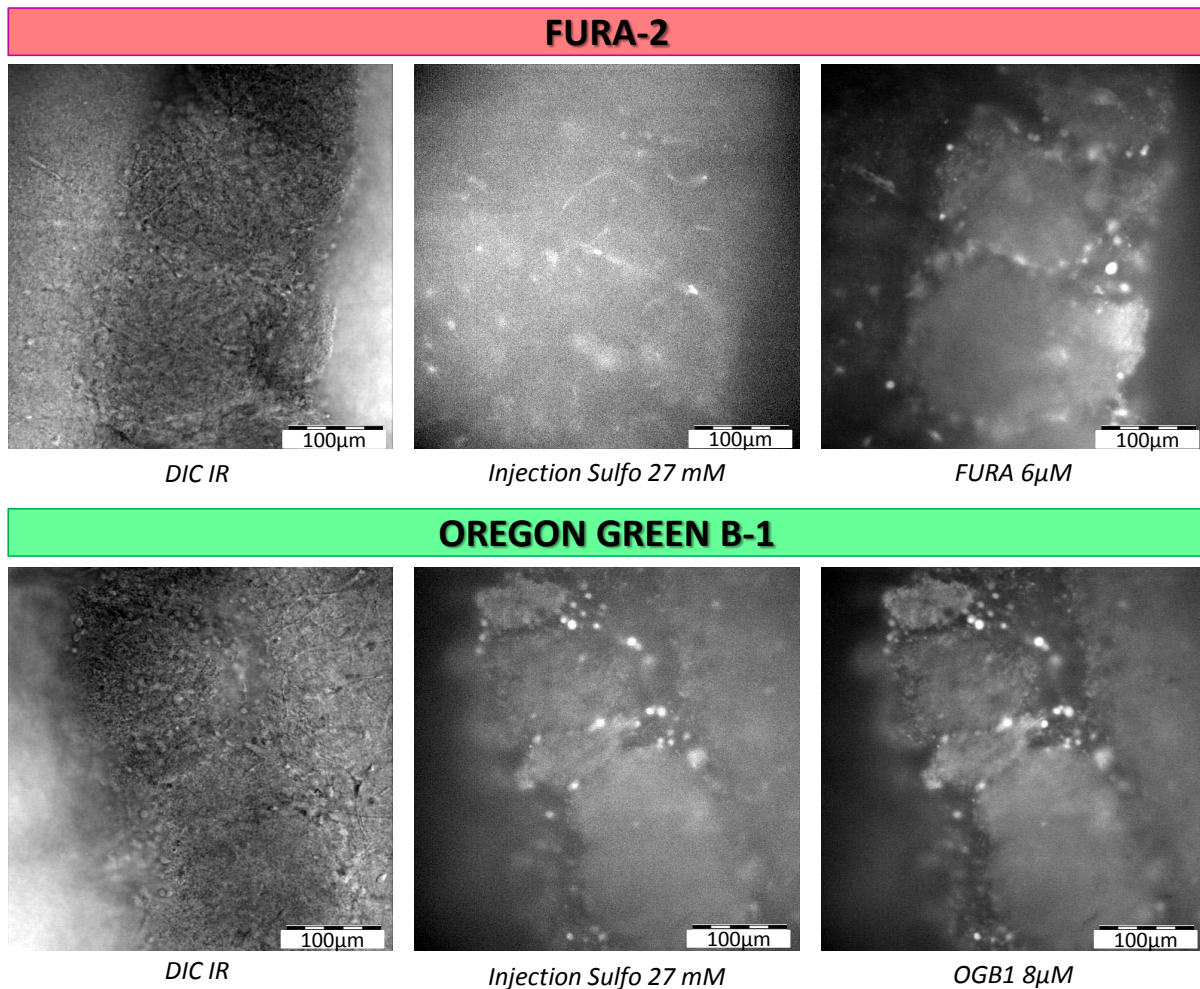


Figure 84: Mise au point des techniques d'imagerie calcique dans le BO: Comparaison de deux sondes calciques (FURA-2 vs OREGON GREEN B-1 (OGB1)) pour l'étude de la signalisation calcique astrocytaire du BO

Les deux sondes calciques testées sont : le FURA-2 (6µM – $\lambda_{\text{émission}}$: 510nm) et l'OGB1 (8µM - $\lambda_{\text{émission}}$: 523nm). Les tranches de BO ont été réalisées à partir de rats âgés de 5 semaines. Les photos sont prises au niveau de la couche glomérulaire. Chaque zone glomérulaire est prise en photo en DIC/IR, en fluorescence à la sulfoG et au FURA-2 ou OGB-1. La sulfoG est un colorant fluorescent spécifiquement capté par les astrocytes ($\lambda_{\text{émission}}$: 548nm).

Les photos ont été réalisées à partir du logiciel XcellenceRT à l'objectif 40X.

Nos résultats, présentés dans la figure 85, montrent une amélioration au cours du temps de l'efficacité de chargement en sulfo G et en FURA-2 des astrocytes glomérulaires en présence de MK571. Néanmoins, cette amélioration semble s'accompagner également d'un allongement du temps nécessaire à l'amélioration du ratio signal/bruit, nous permettant de discerner les cellules chargées (environ 5h). Par ailleurs, nous avons constaté que cette durée (trop) importante avait un impact négatif sur la viabilité des tranches de BO et la capacité de réponse des astrocytes à une stimulation (ATP, tACPD).

Il apparaît donc dans ces conditions que l'étude de la signalisation calcique astrocytaire dans le BO de rat semble difficilement réalisable par les techniques d'imagerie calcique classiquement utilisées. Après plusieurs discussions avec d'autres équipes de recherche travaillant sur le BO, nous avons constaté que les problèmes rencontrés pendant nos mises aux points sont récurrents et restent pour le moment non résolus. Les alternatives envisageables seront rapidement évoquées dans la partie perspective de la discussion. Elles n'ont pas pu être développées dans le cadre de la thèse par manque de temps.

Chargement en Sulforhodamine G et FURA-2 puis récupération des tranches en présence de MK571

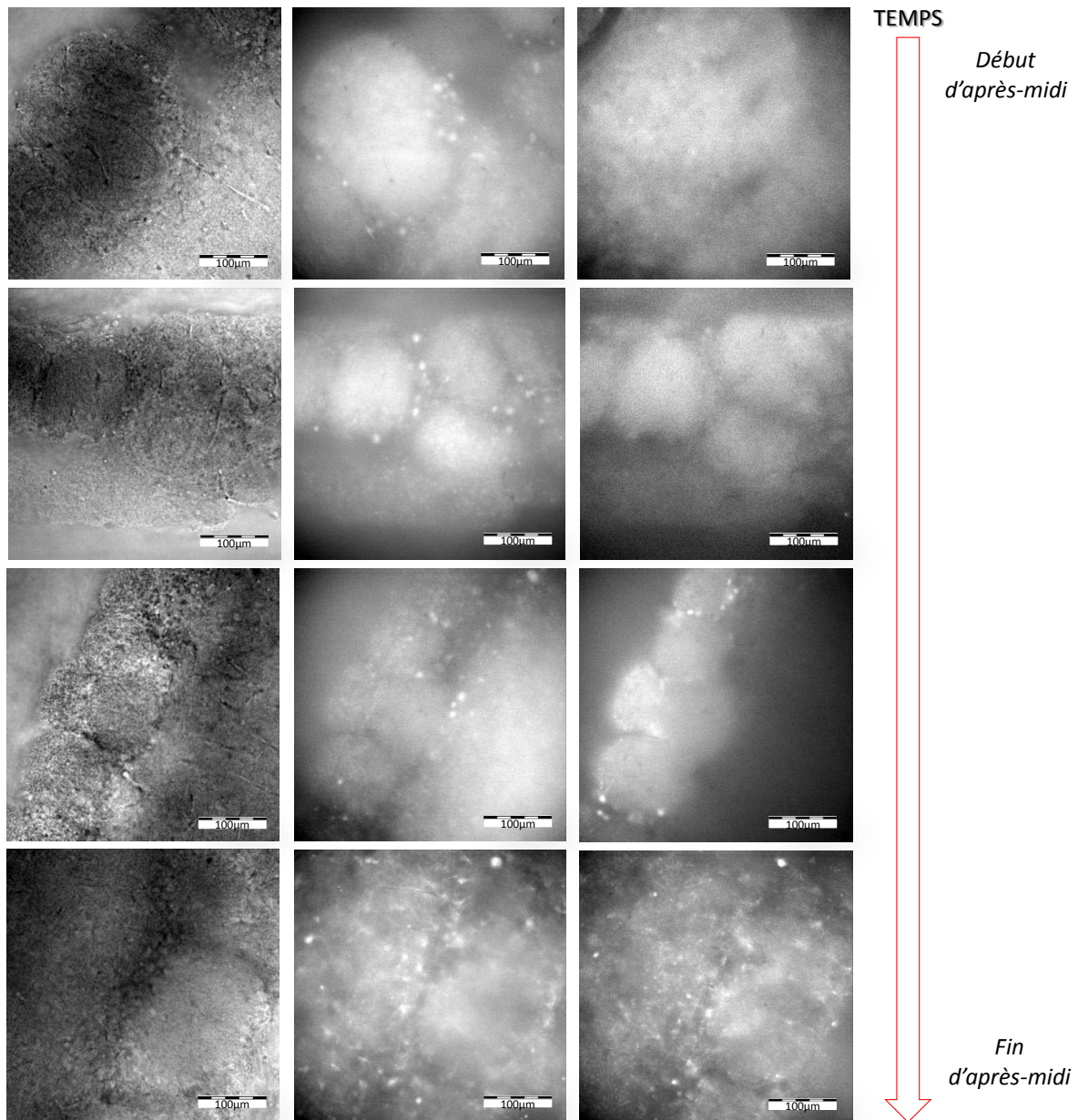


Figure 85: Mise au point des techniques d'imagerie calcique dans le BO: Effet de l'inhibition des transporteurs MRP1 sur la pénétration de la sulfoG et du FURA-2

Le FURA-2 ($6\mu\text{M}$ – $\lambda_{\text{émission}}$: 510nm) est une sonde calcique permettant la visualisation des variations de calcium intracellulaire. La sulfoG est un colorant fluorescent spécifiquement capté par les astrocytes ($\lambda_{\text{émission}}$: 548nm). Les tranches de BO ont été réalisées à partir de rats âgés de 5 semaines. Elles sont incubées en présence de MK571, un inhibiteur des transporteurs MRP1 impliqués dans la détoxification cellulaire de nombreux composés cytotoxique. L'effet du MK571 sur la pénétration de la sulfoG et du FURA-2 à été observé en fonction du temps. Les photos sont prises au niveau de la couche glomérulaire. Chaque zone glomérulaire est prise en photo en DIC/IR (photos de gauche), en fluorescence à la sulfoG (photos au milieu) et au FURA-2 (photos de droites). Les photos ont été réalisées à partir du logiciel XcellenceRT à l'objectif 40X.

DISCUSSION

Discussion

L'olfaction joue un rôle essentiel dans la régulation hédonique de la prise alimentaire. Influencée par l'état nutritionnel de l'individu, la modulation de la perception olfactive adapte la palatabilité des aliments aux besoins énergétiques, renforçant ou inhibant la recherche et la prise alimentaire. Notre étude a cherché à préciser les mécanismes qui sous-tendent l'adaptation de la sensibilité olfactive à l'état nutritionnel de l'individu en ciblant les interactions neurones-astrocytes des glomérules du bulbe olfactif, siège des synapses glutamatergiques entre OSN et cellules mitrales. Nous avons mis en évidence une augmentation du déploiement des prolongements astrocytaires dans les glomérules du BO chez le rat à jeun comparativement au rat nourri, et nous avons montré que cette plasticité astrocytaire était sous l'influence de la glycémie et de peptides orexigènes/anorexigènes impliqués dans la régulation de la prise alimentaire.

I. Modifications du déploiement astrocytaire dans les glomérules du bulbe olfactif en fonction de l'état métabolique

Le jeûne augmente le déploiement astrocytaire dans les glomérules du bulbe olfactif

Nos résultats montrent une augmentation de la surface GFAP au sein des glomérules chez les rats à jeun. Cette augmentation est spécifique de la couche glomérulaire car nous n'observons pas de variation de la surface GFAP dans la couche avoisinante (couche plexiforme externe) chez les rats à jeun. Les analyses par le plugin Image J Skeleton montrent que l'augmentation de la surface GFAP est associée à une augmentation de la densité du réseau astrocytaire (augmentation du nombre de segments GFAP et des intersections) dans les glomérules. L'augmentation du marquage GFAP peut donc être interprétée comme une augmentation du déploiement des prolongements astrocytaires en situation de jeûne.

Alternativement, l'augmentation de la GFAP que nous observons en situation de jeûne aurait pu résulter d'une migration, d'une multiplication ou d'une réaction (astroglie) des astrocytes au niveau des glomérules. Ces hypothèses sont très peu probables. Nous n'observons pas davantage de corps astrocytaires, ni en bordure ni au sein des glomérules, chez les rats à jeun, ce qui exclut une migration ou une multiplication des astrocytes, dont il n'y a par ailleurs pas d'exemple, à notre

connaissance, dans le cerveau adulte (Bardehle et al., 2013) hormis lors de réactions astroglotiques en réaction à une lésion (accidents vasculaires cérébraux, traumatismes, croissance tumorale ou maladie neurodégénérative (Götz et al., 2015)). La réaction astroglotique s'accompagne d'une augmentation de l'épaisseur et de la tortuosité des prolongements principaux riches en GFAP, ce que nous n'avons pas observé dans les glomérules des rats à jeun. De plus, l'astroglie est généralement associée à une activation microgliale, or l'immunomarquage IBA1 que nous avons réalisé est similaire chez les rats nourris et à jeun au niveau des glomérules comme dans l'ensemble du BO.

De plus, l'analyse de l'expression protéique de marqueurs astrocytaires dans le BO (western blot), que nous avons réalisée, ne montre pas d'augmentation globale de GFAP ni de variation d'expression de GLAST et de GLT-1 dans l'ensemble du BO chez les rats à jeun, ce qui serait le cas si il y avait une augmentation du nombre d'astrocytes ou une réaction astrocytaire (Götz et al., 2015).

Nos résultats montrent par ailleurs que le jeûne n'a pas eu d'influence sur la taille des glomérules, ce qui permet d'exclure que l'augmentation de la surface relative marquée par la GFAP soit liée à une réduction de la taille des glomérules chez les rats à jeun. L'augmentation de la GFAP dans les glomérules résulte donc d'un allongement et/ou d'une augmentation du nombre des prolongements des astrocytes glomérulaires.

De telles variations du déploiement astrocytaire en réponse à des situations physiologiques ont déjà été mises en évidence, par immunomarquage de la GFAP, dans les NSC en réponse aux variations du cycle jour-nuit (Lavialle and Servièrre, 1995), dans les NSO en période de lactation, dans les noyaux arqués et pré-optiques en réponse à des variations hormonales (Theodosis et al., 2008a). Ces variations du déploiement astrocytaire sont réversibles et relativement rapides. Dans les NSC du hamster, le déploiement des astrocytes varie d'environ 30% de façon réversible au cours du cycle de 24h (Becquet et al., 2008; Lavialle et al., 2001); dans les NSO, la parturition, la lactation ou la déshydratation induisent une rétraction des prolongements astrocytaires en contact avec les neurones magnocellulaires en quelques heures seulement (Theodosis et al., 2008b). L'injection d'estradiol chez des rates ovariectomisées induit un déploiement astrocytaire dans le noyau arqué en seulement 2h (Theodosis et al., 2008b). Sur des tranches d'hypothalamus en survie, les modifications induites du déploiement astrocytaire sont observées en moins d'une heure (Theodosis et al., 2008b). Le processus de déploiement astrocytaire que nous observons après 17h de jeûne est donc compatible, en termes de cinétique, avec les processus décrits dans la littérature.

Dans ces différents modèles, le déploiement des prolongements principaux (immunomarqués pour la GFAP), s'accompagne d'une augmentation de la présence astrocytaire au contact des neurones, caractérisée par une augmentation de la présence des PAPs, ces fins prolongements pérисynaptiques

astrocytaires dépourvus de GFAP, qui viennent de façon dynamique au contact des synapses (Hirrlinger et al., 2004; Reichenbach et al., 2010). Il est probable que l'augmentation du déploiement des prolongements GFAP chez les rats à jeun soit associée à une augmentation des PAPs dans les zones synaptiques. Pour le confirmer, il faudrait analyser l'étendue de la couverture astrocytaire au sein des glomérules en fonction de l'état nutritionnel, en microscopie électronique. Pour essayer de préciser nos analyses de marquage GFAP, nous avons réalisé par immunohistochimie une analyse des PAPs grâce au marquage de l'ézrine (figure 86). L'ézrine est une protéine reliant l'actine à la membrane, présente dans les PAPs astrocytaires (Derouiche and Frotscher, 2001; Grönholm et al., 2005) ; elle joue un rôle essentiel dans la motilité des PAPs (Lavialle et al., 2011).

En accord avec la littérature, l'analyse en microscopie optique des PAPs dans le BO, par marquage immunohistochimique de l'ézrine, s'est révélée difficile du fait de l'extrême finesse de ces prolongements pérисynaptiques (<50nm). Les astrocytes glomérulaires présentent un marquage ezrine relativement faible, qu'il serait impossible de quantifier, même à fort grossissement. Il montre néanmoins la présence des PAPs astrocytaires dans les glomérules. Le marquage de l'ézrine est par ailleurs très intense au niveau des cellules engainantes entourant les axones des neurones olfactifs en provenance de la muqueuse olfactive.

La forme phosphorylée de l'ézrine (la phosphoezrine T567), impliquée dans la formation et la motilité des filopodes, semble spécifique aux PAPs astrocytaires (Lavialle et al., 2011). Il sera intéressant d'utiliser plutôt le marquage de la phospho-ezrine T567, dans les glomérules, en fonction de l'état nutritionnel, et de l'étudier en microscopie confocale.

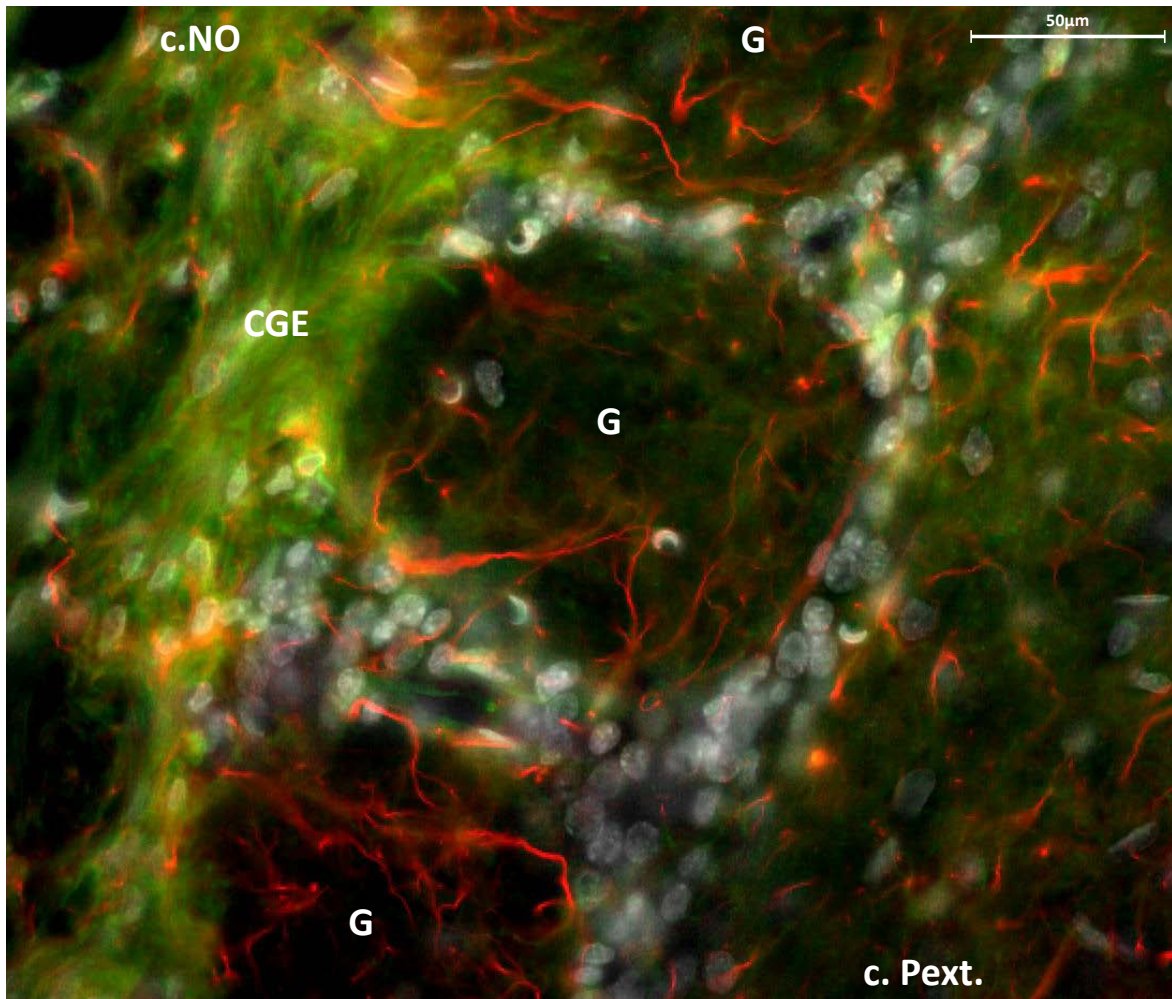


Figure 86: Visualisation des prolongements astrocytaires périssynaptiques (PAPs) par le marquage de l'ézrine non phosphorylée

Marquage immunohistochimique des prolongements astrocytaires périssynaptiques (PAPs) marqués par l'ézrine non phosphorylée (vert), des prolongements astrocytaires marqués par la GFAP (rouge) et des noyaux marqués par du Hoechst (gris).

On observe une forte densité du marquage de l'ézrine au niveau des cellules gliales engainantes (CGE) qui entourent les axones des neurones olfactifs. Les astrocytes glomérulaires apparaissent moins marqués par l'ézrine. Le marquage de l'ézrine et la résolution d'image en épifluorescence semblent insuffisants pour permettre une analyse fine des PAPs astrocytaires dans les glomérules.

Image prise en épifluorescence à l'objectif 40X sur une coupe horizontale de 20µm d'épaisseur de BO de rat nourri.

c.CG: couche des cellules granulaires; c.NO: couche des nerfs olfactifs; CGE: cellules gliales engainantes; c.Pext.: couche plexiforme externe; G: glomérule.

Interprétation possible de l'impact de l'augmentation du déploiement astrocytaire dans les glomérules, en situation de jeûne, sur la transmission du signal olfactif

Même s'il apparaît relativement diffus et non quantifiable au sein des glomérules, le marquage ezrine montre la présence de nombreux PAPs autour des prolongements GFAP, répartis dans toute la surface des glomérules. Les études en microscopie électronique de Chao et al. (1997) indiquent de façon plus précise la localisation de ces PAPs dans les glomérules (Chao et al., 1997a). Ces auteurs identifient, deux compartiments, au sein des glomérules, en fonction de la nature des régulations qui s'exercent sur les cellules mitrales. Un compartiment dit « sensoriel » qui regroupe les synapses sensorielles axo-dendritiques entre les neurones olfactifs et les cellules mitrales; et un compartiment « non-sensoriel » regroupant les synapses dendro-dendritiques entre les neurones peri-glomérulaires et les mitrales ainsi que les synapses axo-dendritiques entre les projections des fibres centrifuges en provenance des régions plus centrales et les cellules péri-glomérulaires et mitrales (figure 87). D'après les travaux de Chao et al. (1997) et de Kasowski et al. (1999), les PAPs astrocytaires sont présents au niveau des synapses dendro-dendritiques et axodendritiques du compartiment non-sensoriel et semblent être exclus des synapses axo-dendritiques du compartiment sensoriel (Chao et al., 1997b; Kasowski et al., 1999b). La présence de prolongements astrocytaires semble également faire barrière entre les compartiments sensoriels et non-sensoriels. Ces auteurs observent par ailleurs une grande variation de la présence astrocytaire d'un glomérule à l'autre, tout comme nous l'avons observée avec la GFAP.

Sur la base de ces travaux, nous pouvons envisager que l'augmentation du déploiement astrocytaire observée en situation de jeûne concerne principalement le recouvrement astrocytaire dans le compartiment non-sensoriel et/ou le niveau de la « barrière » astrocytaire entre les compartiments sensoriels et non-sensoriels. Les régulations qui s'exercent sur les cellules mitrales dans le compartiment non-sensoriel sont complexes du fait de la présence à la fois d'afférences excitatrices (des cellules péri-glomérulaires glutamatergiques (très minoritaires) et des fibres centrifuges) et d'afférences inhibitrices (des cellules péri-glomérulaires GABAergiques et dopaminergiques), toutes interconnectées entre elles et pouvant réguler à la fois directement et indirectement les mitrales, ce qui rend l'interprétation globale de ces régulations difficile. De plus, le compartiment non-sensoriel reçoit des afférences centrifuges « feedback », glutamatergiques, en provenance des zones corticales olfactives vers lesquelles projettent les cellules du BO, mais également de nombreuses afférences « neuromodulatrices » de trois grandes origines : le Raphé pour les fibres sérotoninergiques, le Locus Coeruleus pour les fibres noradrénergiques, et la bandelette latérale de Broca du télencéphale basal pour les fibres cholinergiques (Matsutani et Yamamoto 2008, Fletcher et Chen 2010) (Figure 87).

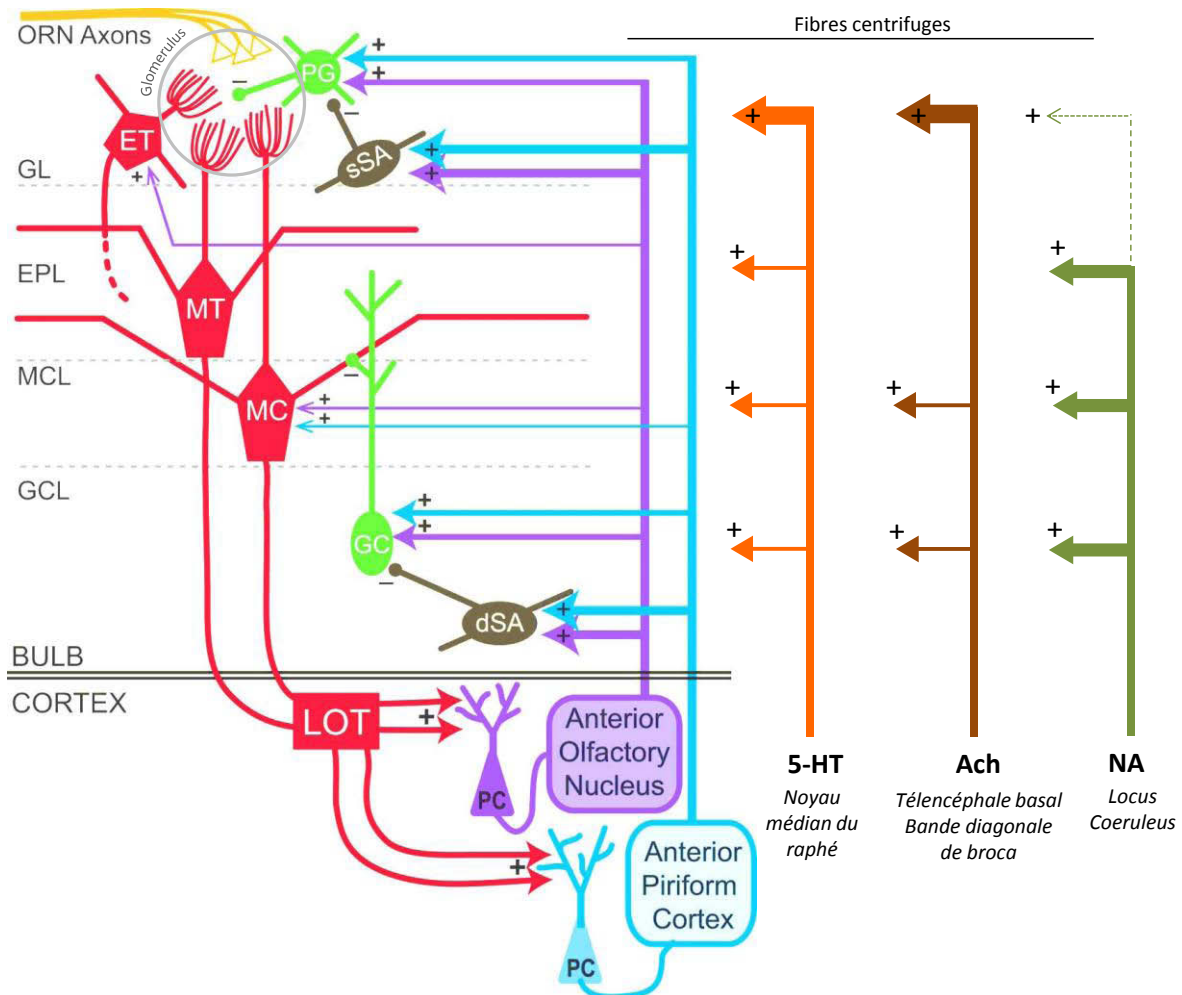


Figure 87: Représentation schématique des différentes connexions neuronales dans le bulbe olfactif (D'après Oswald and Urban, 2012)

Les cellules pyramidales (PC) dans le noyau olfactif antérieur (violet) et le cortex piriforme antérieur (bleu) reçoivent les informations olfactives par les cellules mitrales (MC) et les cellules à panaches (MT) du bulbe olfactif *via* le tractus olfactif latéral (LOT). Les PCs (lignes bleues - violettes) et les fibres centrifuges sérotoninergiques (5-HT) (ligne orange), cholinergiques (Ach) (ligne marron) et noradrénergiques (NA) (ligne verte) projettent vers le BO. La force de connexion est représentée schématiquement par l'épaisseur des lignes. Les PCs et les fibres 5-HT et Ach, font synapse majoritairement avec les interneurons inhibiteurs dans la couche des cellules granulaires (GCL) et la couche glomérulaire (GL). Dans la couche glomérulaire, l'activation par les PCs, des neurones péri-glomérulaires inhibiteurs (les PG et les neurones superficiels à axone court (sSA)) stimule les circuits neuronaux des régulations inhibitrices qui s'exercent sur les cellules MC et MT dans les glomérules.

Abréviations: ORN Axons: Axones des neurones olfactifs; GL: Couche glomérulaire; EPL: Couche plexiforme externe; MCL: Couche des cellules mitrales; GCL: Couche des cellules granulaires; ET: Cellules à panache externe; PG: Neurones péri-glomérulaires inhibiteurs; sSA: Neurones superficiels à axone court de la couche glomérulaire; MT: Cellules à panaches; MC: Cellules mitrales; GC: Cellules granulaires; dSA: Neurones profonds à axone court de la couche granulaire; LOT: Tractus latéral olfactif (Fibres centripètes); PC: Cellules pyramidales; 5-HT: sérotonine; Ach: Achétylcholine, NA: Noradrénaline.

Il est difficile de tracer un schéma synthétique, clair et complet, de toutes les modulations, au niveau du compartiment non-sensoriel des glomérules puis dans les couches plus internes du BO, qui aboutissent à une modulation fine du signal olfactif transmis par les cellules mitrales. Elles participent globalement aux phénomènes de sensibilité, de discrimination, de reconnaissance, d'apprentissage, et de mémorisation des odeurs, en lien étroit avec l'état physiologique et émotionnel de l'individu (Liu et al., 2012; Nagayama et al., 2014; Pérez and Wachowiak, 2008). L'augmentation du déploiement astrocytaire, en situation de jeûne, dans le compartiment non-sensoriel, pourrait donc modifier les régulations péri-glomérulaires et centrifuges qui s'exercent sur les cellules mitrales. Pour définir plus précisément les conséquences de ce déploiement, il faudrait pouvoir identifier en microscopie électronique les types de synapses concernés par l'augmentation des prolongements astrocytaires (les fibres centrifuges, et dans ce cas lesquelles, et les péri-glomérulaires excitatrices ou inhibitrices). Néanmoins, notre hypothèse est que, de la même façon que ce qui est observé dans le NSO lorsque les astrocytes sont déployés (Theodosios et al., 2008a), l'augmentation des prolongements astrocytaires au sein du compartiment non-sensoriel des glomérules permettrait de renforcer le contrôle astrocytaire au niveau des terminaisons neuromodulatrices et des synapses entre cellules péri-glomérulaires et cellules mitrales, limitant ainsi leur influence sur la transmission du signal olfactif.

Globalement, l'augmentation du déploiement astrocytaire au sein des glomérules pourrait ainsi « libérer » les cellules mitrales des influences non-sensorielles supérieures au bénéfice d'une activation sensorielle des cellules mitrales par les neurones olfactifs. En situation de jeûne, le signal sensoriel issu des neurones olfactifs serait ainsi transmis aux mitrales plus directement. Ceci pourrait avoir pour conséquence une augmentation de l'activité des cellules mitrales, telle qu'elle a été observée par plusieurs auteurs dans des situations de jeûne (Apelbaum et al., 2005; Pager et al., 1972), en association avec une augmentation de sensibilité olfactive (Aimé et al., 2007) (figure 88).

Il est probable que l'augmentation de la présence astrocytaire dans le compartiment non-sensoriel, se localise, entre autres, au niveau des synapses inhibitrices GABAergiques (majoritaires) pour en atténuer l'activité. Les astrocytes modulent la transmission GABAergique grâce aux transporteurs du GABA (les GATs) qu'ils expriment et qui jouent un rôle clé dans le contrôle de la concentration de GABA extracellulaire. La régulation du GABA extracellulaire, par les astrocytes, donne ainsi le ton de l'inhibition GABAergique dans les circuits neuronaux locaux (Farrant and Nusser, 2005; Nusser and Mody, 2002) en particulier pendant les périodes d'activité neuronale intense (Kersanté et al., 2013).

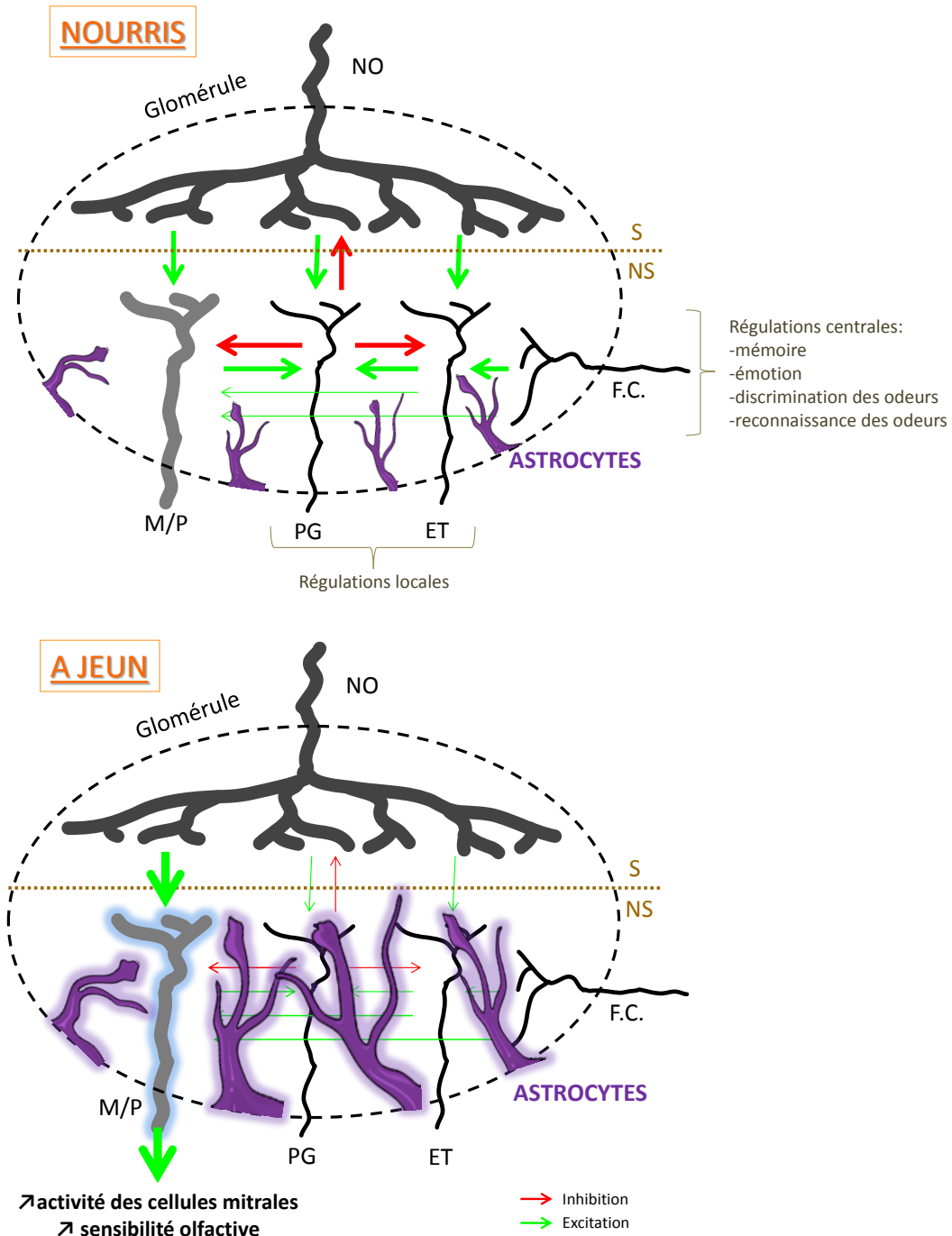


Figure 88: Régulation de la neurotransmission du signal olfactif par les astrocytes en fonction du statut nutritionnel des rats

L'augmentation de couverture par les prolongements astrocytaires dans le compartiment « neuromodulateur - non-sensoriel » des glomérules en situation de jeûne permettrait de lever une partie du tonus inhibiteur des neurones péri-glomérulaires sur les cellules mitrales. Cette plasticité morphologique participerait à l'augmentation de l'activité des cellules mitrales observée par plusieurs auteurs en situation de jeûne (Apelbaum et al., 2005; Pager et al., 1972), qui est associée à une augmentation de la sensibilité olfactive (Aimé et al., 2007).

NO: Neurones olfactifs; M/P: Cellules mitrales et à panaches; PG: Neurones péri-glomérulaires inhibiteurs; ET : Cellules à panache externe (neurones péri-glomérulaires excitateurs); F.C.: Projections des fibres centrifuges, sérotoninergiques et cholinergiques; S: Compartiment sensoriel; NS: Compartiment non-sensoriel.

Les astrocytes du BO ont également la particularité de pouvoir, simultanément, inhiber et activer des populations neuronales spécifiques en libérant à la fois du GABA (qu'ils synthétisent grâce à l'activité de l'acide glutamique décarboxylase (GAD 67 et 65)(Losi et al., 2014) et du glutamate (Kozlov et al., 2006). Il est possible que cette double libération se produise à partir de sites distincts en contacts avec différentes synapses (Losi et al., 2014) comme cela a été montré dans l'hippocampe (Le Meur et al., 2012) (Figure 89). Ainsi, l'augmentation du déploiement astrocytaire dans le compartiment non-sensoriel pourrait permettre aux astrocytes de diminuer l'activité des synapses inhibitrices s'exerçant sur les mitrales et de contribuer ainsi à l'amplification de la transmission du signal olfactif entre les neurones olfactifs et les cellules mitrales. La régulation astrocytaire de l'activité synaptique passe notamment par la recapture des neurotransmetteurs et la libération de plusieurs gliotransmetteurs (GABA, d'ATP, de glutamate, de D-sérine ...). La libération de ces gliotransmetteurs, au niveau des neurones péri-glomérulaires inhibiteurs, permettrait entre autres, de diminuer la réactivité des neurones aux signaux GABAergiques (*via* l'ATP) (Lalo et al., 2014) et de réduire la transmission inhibitrice des neurones inhibiteurs (*via* l'action du glutamate astrocytaire sur les récepteurs kainates des neurones GABAergiques) (Liu et al., 2012). L'augmentation de la présence astrocytaire dans l'environnement synaptique du compartiment non-sensoriel glomérulaire, qui comprend les régulations centrales des cellules mitrales, pourrait ainsi jouer un rôle clé dans la régulation de la neurotransmission olfactive en participant à l'amplification du signal olfactif, en situation de jeûne.

La régulation de la neurotransmission par des variations du déploiement astrocytaire observée dans les noyaux hypothalamiques (supra-optique et supra-chiasmatique) illustre bien le fait que la plasticité morphologique astrocytaire puisse être un facteur reliant un état physiologique et l'efficacité d'une réponse neuronale. Dans le noyau supra-chiasmatique, l'augmentation du signal glutamatergique en période diurne entraîne une augmentation du déploiement astrocytaire au niveau de synapses cibles maximisant ainsi le contrôle synaptique par les astrocytes (Becquet et al., 2008; Lavielle et al., 2001). Au sein du noyau supra-optique, les variations d'états hormonaux (lors de la lactation, déshydratation ou parturition) induisent une rétraction des prolongements astrocytaires permettant aux neurones de former de nouvelles synapses et aux astrocytes de moduler différemment la transmission synaptique ce qui conduit à une modification globale de la neurotransmission dans le NSO au cours de la lactation ou déshydratation (Theodosis et al., 2008b).

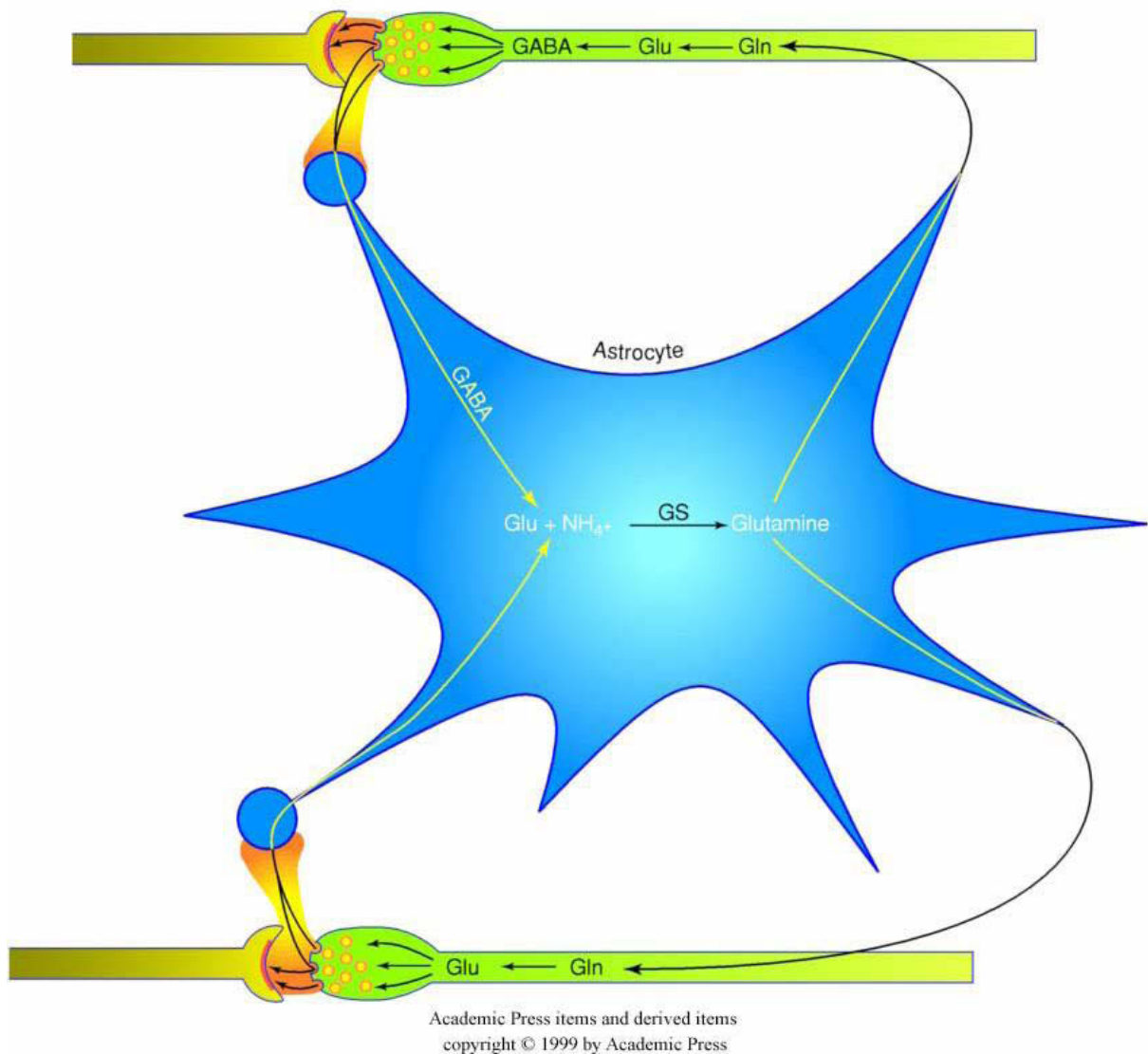


Figure 89: Modulation de la neurotransmission des synapses GABAergiques et glutamatergiques par la libération de glutamine astrocytaire

Les astrocytes du BO ont la particularité de pouvoir synthétiser de la glutamine à partir du GABA et du glutamate libérés par les neurones, qu'ils recaptent au niveau synaptique. La glutamine synthétisée est alors redistribuée aux neurones GABAergiques et glutamatergiques pour leur propre synthèse de GABA ou glutamate. Cette double libération peut se produire à partir de sites de libération distincts en contact avec différents types de synapses (Losi et al., 2014).

Abréviations: Glu: Glutamate; GABA: acide gamma aminobutyrique; GS: Glutamine synthétase; Gln: Glutamine.

Ces deux exemples mettent également en évidence que les variations du déploiement astrocytaire peuvent dépendre de différents effecteurs : soit de l'activité neuronale (comme pour le noyau supra-chiasmatique), soit de facteurs associés à un état physiologique particulier (comme dans le cas du noyau supra-optique). Dans les glomérules, les variations du déploiement astrocytaire pourraient être sous l'influence des peptides régulant la prise alimentaire afin d'adapter le signal olfactif à l'état métabolique, et/ou dépendre de l'activité neuronale glomérulaire qui varie selon l'état métabolique (Prud'homme et al., 2009). Une corrélation entre les fluctuations des potentiels membranaires des astrocytes et le potentiel de champ local mesuré dans les glomérules olfactifs a d'ailleurs été démontrée (Roux et al., 2011). Nous avons étudié, plus en détails, les effecteurs potentiellement impliqués dans l'augmentation du déploiement astrocytaire glomérulaire en situation de jeûne. Ces résultats seront discutés dans le chapitre II.

Effets de la durée du jeûne sur la morphologie des astrocytes glomérulaires

L'augmentation du déploiement astrocytaire dans les glomérules est observée dans toutes les régions du BO (ventral, médian, dorsal) chez les rats à jeun 17h, seulement partiellement (ventral et médian) lorsque les rats sont à jeun depuis 24h, mais elle est absente dans les glomérules des rats mis à jeun pendant 48h. L'état de faim induit par la mise à jeun des animaux, semble affecter différemment le déploiement des astrocytes glomérulaires en fonction de la durée du jeûne et de la région du BO.

Ces différences pourraient résulter de l'implication de régulations métaboliques initiées lors des jeûnes plus prolongés et qui ne sont pas, ou faiblement, activées à 17h de jeûne. Le jeûne de 17h est caractérisé par une perte de poids relativement modeste (-6% du poids initial), une glycémie et une leptinémie significativement diminuées ainsi qu'une motivation alimentaire augmentée par rapport aux animaux nourris. Ces modifications physiologiques et comportementales permettent à l'organisme de s'adapter à une privation alimentaire d'une durée proche de celle à laquelle les rats se soumettent quotidiennement pendant leur phase diurne (phase d'inactivité). En revanche, les animaux à jeun 48h, bien que présentant des paramètres glycémiques et leptinémiques non différents des animaux à jeun 17h, atteignent une situation métabolique critique considérée comme stressante pour l'animal (Dietze et al., 2016), compte tenu de l'importante perte de poids (-18% du poids initial). D'ailleurs, lors des tests de motivation à rechercher la nourriture, les rats à jeun 48h ont présenté clairement des signes d'affaiblissement (lenteur et apathie).

Au-delà de 24h de jeûne, pour la plupart des espèces, l'organisme enclenche des mécanismes d'adaptation pour économiser de l'énergie, caractérisant le passage vers un état considéré plus critique, voire pathologique (Rowland, 2007). Dans cette situation, l'organisme peut entrer en état de

stress, caractérisé par l'activation de l'axe corticotrope et l'augmentation de la corticostérone plasmatique. La durée de jeûne induisant un stress est variable selon les modèles. Kmiec *et al.* (2006) évoquent l'absence d'augmentation de la corticostérone lors d'un jeûne de 24h chez le rat Wistar de 20 mois. Cependant, le rat âgé est *a priori* plus résistant au jeûne que les rats de 5 semaines utilisés dans cette étude. Des rats Sprague-Dawley présentent eux, une augmentation significative de corticostérone après 24h de jeûne (Kmiec *et al.*, 2006; Nowland *et al.*, 2011). Par conséquent, il serait intéressant pour compléter notre étude de doser et de comparer la corticostérone plasmatique des rats nourris et à jeun depuis 17h, 24h et 48h, afin de caractériser plus précisément leur état de stress. L'effet du stress, et la diminution de l'appétit qu'il induit en général chez le rat, pourrait expliquer l'absence de déploiement astrocytaire glomérulaire chez les rats à jeun depuis 48h.

Sur la base des travaux montrant une sensibilité olfactive accrue chez des animaux à jeun (Aimé *et al.*, 2007), l'augmentation du déploiement astrocytaire chez les animaux à jeun 17h pourrait être associée à une activité plus forte des neurones olfactifs. Des études menées dans l'unité, sur l'impact du stress (chronique et aigu) au niveau du système olfactif, ont mis en évidence que les glucocorticoïdes, libérés par l'axe corticotrope en situation de stress, entraînent une diminution de la réponse électro-physiologique aux odorants dans la MO chez le rat. Cet effet est associé à une perte de neurones olfactifs par apoptose (stress chronique) impactant la sensibilité olfactive chez ces animaux (Raynaud *et al.*, 2015a, 2015b). Nous pouvons donc émettre l'hypothèse que l'absence de déploiement astrocytaire dans les glomérules de BO de rats à jeun 48h est la conséquence d'une absence d'augmentation de l'activité olfactive. Des enregistrements d'EOG réalisées au laboratoire sur des rats wistar adultes à jeun depuis 48h montrent des amplitudes des réponses olfactives diminuées tout comme c'est le cas à la suite d'un stress aigu (Meunier *et al.*, Bombail *et al.*, non publié). Il serait intéressant, pour le confirmer, de réaliser des tests comportementaux permettant de mesurer précisément la sensibilité olfactive des animaux (Aimé *et al.*, 2007) afin d'identifier ses possibles variations entre les différentes durées de jeûne.

Les glucocorticoïdes ont également un impact sur la morphologie et la fonctionnalité des astrocytes. Le stress chronique chez le rat, entraîne une atrophie astrocytaire en diminuant la longueur, les ramifications et le volume des prolongements astrocytaires (Tynan *et al.*, 2013). La littérature fournit des données assez contradictoires sur l'impact du stress (et des hormones associées) sur la régulation de la GFAP. Les études sur des cultures d'astrocytes ont montré une augmentation de l'expression du gène de la GFAP après une courte (6 ou 24h) ou longue (3 semaines) exposition à la corticostérone. En revanche, les niveaux d'expression de la GFAP sont diminués lorsque les astrocytes sont en co-culture avec des neurones (Rozovsky *et al.*, 1995). Sur des cultures d'astrocytes corticaux de rat, notre équipe a montré que la corticostérone (2 à 6 jours) oriente les astrocytes vers

une morphologie pavimenteuse en rétractant les prolongements principaux et périphériques (Champeil-Potokar et al., 2016). Des études *in vivo* ont également rapporté une diminution de l'expression de la GFAP et du nombre d'astrocytes marqués par la GFAP dans l'hippocampe et le cortex de rat après un traitement chronique par la corticostérone ou l'induction de stress chronique en début de vie (Leventopoulos et al., 2007; Nichols et al., 1990; O'Callaghan et al., 1991; Unemura et al., 2012). Cependant certains modèles animaux de stress ont montré qu'il y avait une augmentation de 30% des astrocytes marqués par la GFAP dans l'hippocampe après six jours d'activités stressantes (Lambert et al., 2000). Même si il est difficile de conclure de façon précise, ces données nous indiquent que le stress chez l'animal entraîne des remodelages importants du réseau astrocytaire. La fonctionnalité du réseau astrocytaire est également impactée par le stress. *In vivo* comme *in vitro*, les glucocorticoïdes stimulent l'absorption et le recyclage du glutamate par les astrocytes (Champeil-Potokar et al., 2016; Reagan et al., 2004; Zschocke et al., 2005) ainsi que l'expression du transporteur astrocytaire au glutamate GLT-1 (Zschocke et al., 2005). En revanche les glucocorticoïdes ne semblent pas avoir d'effet sur l'expression du transporteur astrocytaire GLAST. Au vu de ces données, le stress subi par les animaux à jeun depuis 48h est probablement un facteur impactant la plasticité astrocytaire, susceptible de contrer le déploiement astrocytaire induit par l'état métabolique.

L'utilisation d'animaux stressés risquant d'entraîner des biais dans l'analyse de nos résultats, compte tenu de la sensibilité au stress du système olfactif et des astrocytes, et compte-tenu de l'ensemble de nos observations préliminaires, nous avons choisi de cibler l'étude sur le jeûne de 17h, moins sévère que celui de 24h et 48h, et qui induit une augmentation maximale du déploiement astrocytaire comparativement aux animaux nourris *ad libitum*.

La plasticité morphologique des astrocytes est maintenue dans la région ventrale pour des jeûnes plus prolongés

Les animaux à jeun 24h présentent une augmentation de déploiement astrocytaire glomérulaire uniquement dans les régions médianes et ventrales du BO, et les rats à jeun 48h montrent une tendance à l'augmentation de ce déploiement au niveau des glomérules ventraux seulement. Cette régionalisation, plus ventrale, de la plasticité morphologique astrocytaire induite par le jeûne de longue durée, pourrait répondre à l'activation d'un ensemble de neurones olfactifs distincts, présentant des récepteurs spécifiques à la reconnaissance d'odeurs alimentaires.

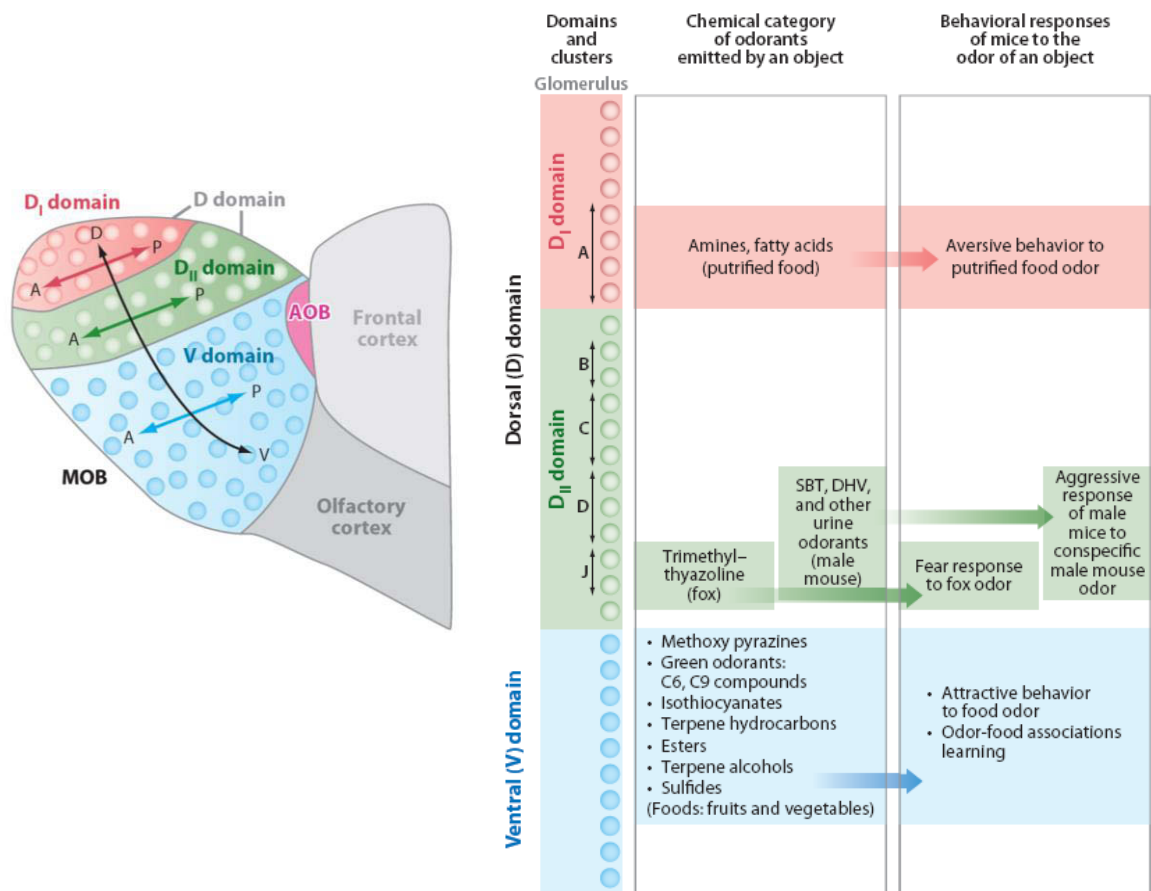


Figure 90: Fonctionnalités moléculaires des différentes régions glomérulaires du bulbe olfactif (D'après Mori et al., 2011)

Figure A: Vue latérale d'une organisation en 3 domaines glomérulaires distincts (domaine dorsal I et II (D_I et D_{II} domain) et domaine ventral (V domain)) dans le bulbe olfactif chez le rongeur. Cette régionalisation glomérulaire est établie en fonction des classes de neurones-récepteurs olfactifs qui projettent dans les glomérules. Les flèches de couleur à double tête indiquent l'axe antéro-postérieur (A-P) de chaque domaine. Les flèches noires indiquent l'axe dorsal-ventral (D-V) de la carte latérale.

Figure B: La colonne de gauche schématise les 3 domaines (et leurs sous-domaines) de la carte olfactive glomérulaire représentant les récepteurs olfactifs. Les regroupements moléculaires (sous-domaines) des glomérules dans le domaine dorsal sont représentés par des flèches. La colonne du milieu liste la nature chimique des odorants qui activent le domaine glomérulaire. L'origine de ces odorants est indiquée entre parenthèses. La colonne de droite liste les réponses comportementales des souris à l'odeur. L'organisation spatiale de la carte olfactive glomérulaire en domaines distincts semble jouer un rôle clé entre les caractéristiques moléculaires spécifiques des odorants et les réponses comportementales de la souris face à l'odeur. Les relations sont représentées par des flèches épaisses avec des couleurs spécifiques aux domaines.

Abréviations: AOB: Bulbe olfactif accessoire; D_I: Domaine dorsale du BO représentant les récepteurs olfactifs de classe I; D_{II}: Domaine dorsal du BO représentant les récepteurs olfactifs de classe II; DHB: Déshydro-exo-brevicomine; SBT: 2-sec-butyl-dihydrothiazole.

Sachant que chaque glomérule reçoit les projections de neurones olfactifs isorécepteurs, la localisation de la neurotransmission et de l'intégration des odeurs alimentaires pourrait être préférentiellement en région ventrale du BO. Ces glomérules seraient alors les cibles préférentielles d'une régulation astrocytaire dépendant de l'activité glomérulaire, en lien avec l'état métabolique.

Les travaux de Mori et al., sur l'étude des cartes olfactives chez les mammifères, vont dans ce sens. Les glomérules ventraux semblent recevoir les axones des neurones olfactifs répondant spécifiquement à des molécules odorantes générant une attraction alimentaire (figure 90) (Mori and Sakano, 2011). Il serait intéressant de réaliser par immunohistochimie un co-marquage de c-fos et de la GFAP dans le BO afin de pouvoir corréliser une augmentation d'activité glomérulaire dans la région ventrale du BO chez les rats à jeun 24h et 48h à un déploiement astrocytaire. Un des objectifs de notre étude était d'ailleurs de relier le déploiement astrocytaire à l'activation neuronale. Le marquage de la protéine c-Fos en immunohistochimie aurait permis de visualiser les neurones et glomérules activés. Nous n'avons cependant pas pu réaliser cette approche, en particulier par manque d'un anticorps fiable et de conditions de marquages reproductibles, mais cela reste évidemment une piste importante à explorer. Une autre piste pour faire le lien avec l'activation glomérulaire est le marquage de V-Glut2, un transporteur vésiculaire neuronal du glutamate, reflétant l'intensité de la transmission glutamatergique.

II. Implication des variations glycémiques et des peptides régulant la prise alimentaire dans le déploiement astrocytaire

L'augmentation de la glycémie et du peptide anorexigène PYY 3-36 chez les rats à jeun abolit l'augmentation du déploiement astrocytaire dans les glomérules

Le jeûne est caractérisé par une diminution de la glycémie, une diminution de la concentration plasmatique des peptides anorexigènes (leptine, PYY 3-36, insuline...) et une augmentation des peptides et neuropeptides orexigènes. Nous montrons que l'augmentation du déploiement astrocytaire chez les rats à jeun est abolie lorsque l'on rétablit chez ces animaux les niveaux de glucose ou de peptide anorexigène PYY3-36 par injection intra-péritonéale. Ces résultats confirment que l'augmentation du déploiement astrocytaire est une plasticité astrocytaire sensible et réversible, et qu'elle est sous le contrôle des facteurs métaboliques qui caractérisent l'état de jeûne.

Nos résultats *in vivo* montrent l'augmentation du déploiement astrocytaire à jeun, lorsque la glycémie est basse, et sa réversion lorsque l'on injecte un bolus de glucose aux rats. La glycémie pourrait donc être un des facteurs agissant sur le déploiement astrocytaire induit par le jeûne dans les glomérules. Lorsqu'il y a une diminution de la glycémie, au cours du jeûne, l'augmentation du déploiement astrocytaire dans les glomérules pourrait refléter un processus de compensation par les astrocytes pour maintenir un apport suffisant de glucose aux neurones. Si c'était le cas, le phénomène serait général et nous observerions aussi une augmentation du déploiement astrocytaire dans les autres couches du BO ; or le déploiement astrocytaire que nous avons mesuré dans la couche adjacente (plexiforme externe) n'est pas modifié chez les rats à jeun.

Les astrocytes n'ont pas uniquement un rôle de transport du glucose des capillaires sanguins vers les neurones. Ils sont également capables d'être des senseurs du glucose dans le SNC, comme cela a été montré dans l'hypothalamus, ce qui leur permet, conjointement avec les neurones, de maintenir l'homéostasie du glucose dans le cerveau (Marty, 2005; Stolarczyk et al., 2010). Le glucose sanguin pourrait donc être un effecteur direct des modifications astrocytaires induites par le jeune.

Nos résultats sur tranches de BO montrent que la diminution de la concentration de glucose dans le milieu n'a pas d'effet sur le déploiement des astrocytes. Même si cette étude reste préliminaire, elle suggère que l'effet de la glycémie n'est pas un effet direct de la concentration en glucose sur le déploiement astrocytaire. Néanmoins, on peut supposer que les variations de glycémie *in vivo* sont détectées au niveau des pieds astrocytaires en contact avec les vaisseaux ; ce qui n'est pas vraiment reproduit *ex vivo* où l'ensemble de la tranche baigne dans le milieu contenant le glucose. La concentration du glucose dans les fluides extracellulaires du BO, a d'ailleurs été montrée comme étant indépendante du statut nutritionnel et ne variant que peu ou pas (Al Koborssy et al., 2014). Par conséquent, les expériences que nous avons réalisées sur tranches de BO ne nous permettent pas d'exclure définitivement l'hypothèse d'un effet direct de la diminution de la glycémie passant par les pieds astrocytaires entourant les capillaires.

La diminution des prolongements astrocytaires dans les glomérules, lorsque l'on rétablit la glycémie par un bolus de glucose chez des rats à jeun, est très probablement un effet indirect. Cet effet pourrait passer par les peptides anorexigènes de la prise alimentaire, comme l'insuline, libérée par les cellules β pancréatiques après une augmentation de la glycémie, ou les peptides PYY3-36 et GLP-1 (pour Glucagon-Like Peptide 1) sécrétés par les cellules-L intestinales en réponse à une arrivée de glucose dans la lumière intestinale (Spreckley, 2015). La stimulation des cellules-L intestinales se fait principalement du côté apical, au contact des nutriments, et conduit à la sécrétion de peptides anorexigènes. Il est peu probable que l'injection de glucose par voie intra-péritonéale permette

l'activation apicale de ces cellules. Cependant, des études montrent que les cellules-L intestinales peuvent également être stimulées au niveau de leur pôle baso-latéral, en contact avec les vaisseaux sanguins, et sécréter ainsi des peptides anorexigènes, comme PYY3-36 ou GLP-1 (Cox et al., 2010; Panaro et al., 2014) (un exemple est illustré dans la figure 91). Les sources possibles de stimulation de cette zone sont les hormones dans la circulation sanguine, les facteurs paracrines de l'épithélium gastro-intestinal ou les activations du système nerveux entérique. Le taux plasmatique de PYY peut ainsi être 2 à 4 fois plus élevé, 10 minutes après l'injection d'un agoniste d'un des récepteurs baso-latéraux des cellules-L intestinales (Le MC4R – figure 91) (Panaro et al., 2014). Au vu de ces données, il est plausible que l'augmentation de la glycémie puisse stimuler les cellules-L intestinales au niveau baso-latéral et entraîner une sécrétion rapide et importante de PYY3-36 ou de GLP-1. Par conséquent et au vu des effets du peptide PYY3-36 sur le déploiement astrocytaire glomérulaire, il est probable qu'il soit un des effecteurs de la rétraction des prolongements astrocytaires, observée chez les rats à jeun injectés au glucose.

Nous avons en effet montré que le peptide anorexigène PYY3-36, injecté in vivo, abolit l'augmentation du déploiement astrocytaire, normalement induit par le jeûne, et entraîne la rétraction des prolongements astrocytaires dans les glomérules lorsqu'il est appliqué directement sur des tranches de BO. Au cours du repas, la sécrétion de PYY3-36 par les cellules intestinales a donc potentiellement un effet « rétractant » sur les astrocytes des glomérules. L'effet du jeûne sur l'augmentation du déploiement astrocytaire pourrait donc être en partie lié à la diminution des niveaux circulants de PYY3-36, qui n'est libéré qu'au cours de la digestion. Il serait intéressant d'étudier l'effet du PYY3-36 sur des cultures primaires d'astrocytes du BO, afin de confirmer l'effet direct de ce peptide anorexigène sur la rétraction des prolongements astrocytaires, et de mettre en évidence l'expression et le rôle éventuel du récepteur Y2R, spécifique du PYY3-36. Au sein du BO, nous avons montré que ce récepteur se localise au niveau des noyaux des astrocytes, des cellules mitrales et périglomérulaires. Le peptide anorexigène GLP-1, sécrété dans des conditions similaires à celles de PYY3-36 serait également un candidat intéressant pour étudier les effets des peptides anorexigènes sur la rétraction des prolongements astrocytaires glomérulaires observée en condition de satiété.

Bien que l'injection de leptine, hormone anorexigène, chez des rats à jeun, diminue leur prise alimentaire, nous montrons que ce peptide n'a pas d'effet sur le déploiement astrocytaire dans les glomérules, ni même lorsqu'il est appliqué directement sur tranche de BO, contrairement à PYY3-36.

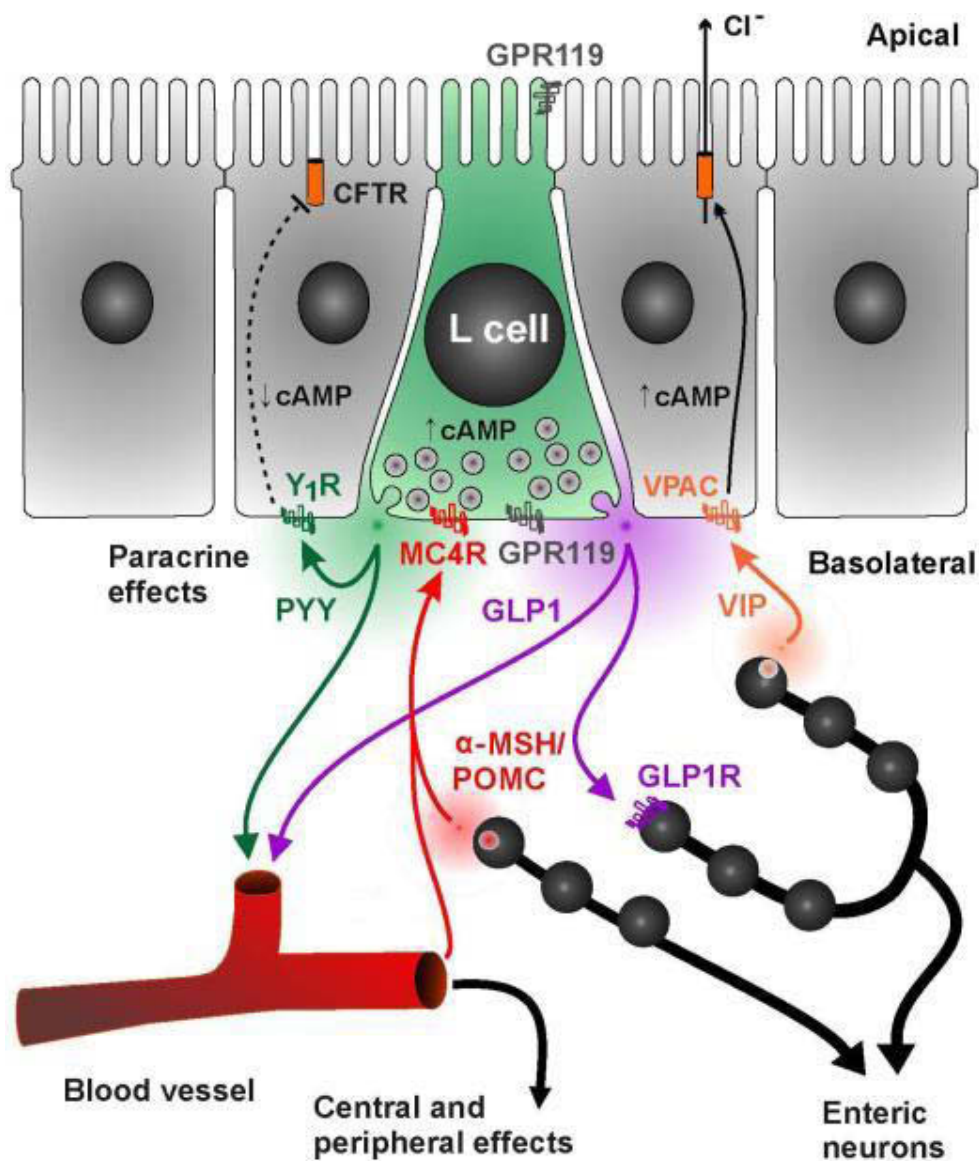


Figure 91: Régulation de la sécrétion gastro-intestinale des peptides PYY3-36 et GLP-1 par activation de MC4R (D'après Panaro et al., 2014):

Les cellules-L intestinales sont situées dans le petit et le gros intestin. Ces cellules peuvent être activées au niveau basolatéral par le système nerveux entérique, des facteurs de la circulation sanguine et des facteurs paracrines de l'épithélium gastro-intestinal. Le récepteur de la mélanocortine-4 (MC4R), localisé principalement sur la face baso-latérale des cellules-L intestinales est capable d'induire la libération de PYY et de GLP-1. La source physiologique du ligand reste à déterminer mais pourrait être l' α -MSH ou un autre dérivé de la mélanocortine POMC. La libération rapide et importante de PYY représente un biomarqueur important pour l'analyse de l'occupation du récepteur MC4R *in vivo*.

Injectée au niveau périphérique, la leptine passe difficilement la barrière hémato-encéphalique du SNC, et son transport se fait essentiellement au niveau de l'hypothalamus médio-basal et du noyau arqué, grâce aux plexus choroïdes du 3^{ème} ventricule (Harrold et al., 2012). L'absence d'effet de la leptine sur les astrocytes glomérulaires *in vivo* pourrait être interprétée comme une incapacité de la leptine à atteindre le BO, par la voie sanguine. Cette hypothèse semble peu probable pour deux raisons: d'une part, la barrière hémato-encéphalique du BO est particulièrement perméable, comparativement au reste du cerveau (Ueno et al., 1996), et permet donc très probablement le passage d'une telle molécule (malgré l'absence de confirmation dans la littérature) ; et d'autre part, l'application de la leptine directement sur tranche de BO, n'a aucun effet sur la morphologie des astrocytes glomérulaires, ce qui tend à démontrer que le problème n'est pas l'accès de la leptine aux cellules du BO. La leptine, exerce pourtant un effet direct sur la morphologie et la fonctionnalité des astrocytes dans l'hypothalamus (García-Cáceres et al., 2014). L'effet de la leptine sur les astrocytes est donc peut-être spécifique de l'hypothalamus. L'absence de co-localisation précise entre les récepteurs à la leptine ObR et la GFAP, en immunohistochimie (*Figure 77, page 188*), pourrait expliquer l'absence d'effet de la leptine sur les astrocytes glomérulaires.

Alternativement, l'absence d'effet de la leptine *in vivo*, sur les astrocytes glomérulaires, pourrait aussi être due à une perte d'efficacité de la leptine, dans un contexte hormonal de jeûne. Des études montrent en effet qu'il existe une synergie entre la leptine et un facteur de satiété, la cholécystokinine (CCK). La CCK est un peptide anorexigène sécrété dans la circulation sanguine par certains entérocytes, en réponse à l'arrivée de lipides et de protéines dans la lumière intestinale. La co-injection de leptine et de CCK diminue de manière dose-dépendante la prise alimentaire. Cet effet est perdu en présence d'un antagoniste des récepteurs de la CCK (Harrold et al., 2012). Même si la localisation précise de cette interaction n'est pas encore claire (*via* les récepteurs de la leptine au niveau du noyau arqué (Morton et al., 2005), du tronc cérébral (Grill et al., 2002) ou des afférences vagales (Peters et al., 2006)), ces données indiquent l'importance d'une voie CCK fonctionnelle dans la synergie entre la CCK et la leptine, pour que cette dernière exerce son effet satiétogène à court terme. Dans notre modèle, les injections de leptine sont réalisées sur des rats à jeun (puisque le but était de mimer un état de satiété chez ces animaux) chez lesquels les niveaux de CCK sont au plus bas, ce qui limite probablement l'effet de la leptine. L'étude de l'effet de la leptine sur la morphologie des astrocytes glomérulaires nécessitant potentiellement la CCK, il serait intéressant de refaire ces expérimentations, avec la leptine, *in vivo* et *ex vivo*, en présence de CCK. L'effet satiétogène résultant de la synergie entre ces deux peptides anorexigènes pourrait, comme pour le PYY3-36, abolir l'augmentation du déploiement astrocytaire glomérulaire chez les rats à jeun, et rétracter les prolongements des astrocytes dans les glomérules. Il faut noter que malgré des niveaux

de CCK bas, limitant probablement l'effet satiétogène de la leptine, les rats à jeun injectés avec la leptine présentent une diminution de leur prise alimentaire.

L'ensemble de nos résultats montrent que l'augmentation du déploiement astrocytaire en situation de jeûne peut être abolie par le rétablissement des niveaux de certains peptides anorexigènes comme PYY3-36, et indirectement par le rétablissement de la glycémie. La rétraction des prolongements astrocytaires dans les glomérules, en situation de satiété, favoriserait l'activité synaptique et/ou la formation de nouvelles synapses dans le compartiment non-sensoriel, intensifiant ainsi les régulations inhibitrices sur les cellules mitrales par les neurones péri-glomérulaires GABAergiques et dopaminergiques. Cette rétraction astrocytaire pourrait ainsi inhiber l'activité des cellules mitrales et diminuer la sensibilité olfactive des individus, après un repas. Cet effet participerait, conjointement avec la régulation de l'homéostasie énergétique, à l'arrêt de la prise alimentaire.

Les peptides orexigènes, ghréline et NPY, sont des effecteurs du déploiement astrocytaire dans les glomérules en situation de jeûne

La libération de ces peptides est maximale en situation de jeûne, minimale en situation de satiété, et leur action au niveau hypothalamique entraîne l'augmentation de la prise alimentaire. Plusieurs études ont par ailleurs montré que le NPY et la ghréline augmentent la sensibilité olfactive des individus (Tong et al., 2011; Negroni et al., 2012; Palouzier-Paulignan et al., 2012). Au vu de nos résultats, cette augmentation de la sensibilité olfactive *via* la ghréline et le NPY pourrait passer en partie par une augmentation du déploiement astrocytaire dans les glomérules et probablement par l'activation des fonctions de régulations astrocytaires, comme cela a été observé dans l'hypothalamus en présence de ghréline (García-Cáceres et al., 2014). En effet, nos résultats montrent que ces peptides orexigènes augmentent le déploiement astrocytaire dans les glomérules, lorsqu'ils sont appliqués sur tranches de BO (*ex vivo*), et sont donc potentiellement les effecteurs du déploiement astrocytaire que nous observons en situation de jeûne *in vivo*. Comme décrit précédemment, l'augmentation des prolongements astrocytaires dans le compartiment non-sensoriel des glomérules permettrait de libérer les cellules mitrales des arrivées dendritiques inhibitrices et donc de favoriser la transmission du signal olfactif entre les neurones olfactifs et les cellules mitrales, et donc d'améliorer les performances olfactives.

Contrairement aux effets observés sur tranche de BO, l'injection de ghréline chez les rats nourris, n'a pas induit de déploiement astrocytaire glomérulaire. Une compétition entre la ghréline orexigène et les peptides anorexigènes, dont les concentrations sont maximales chez les rats nourris, pourrait expliquer l'absence d'effets de la ghréline *in vivo*. La leptine a d'ailleurs été montrée comme pouvant

antagoniser l'action orexigène de la ghréline au niveau hypothalamique (Nakazato et al., 2001). L'absence d'effet de la ghréline *in vivo* peut également s'expliquer par le fait que la ghréline est rapidement dégradée dans la circulation sanguine, réduisant possiblement son effet orexigène au niveau du BO. Chez le rongeur, le temps de demi-vie de l'acétyl-ghréline (forme active de la ghréline) au niveau plasmatique est de 30 minutes et dépend de l'action de la carboxylestérase (De Vriese et al., 2004). Cette estérase est stimulée en condition d'hyperglycémie et dégrade rapidement l'acétyl-ghréline (Xu et al., 2014). L'hyperinsulinémie entraîne également la diminution des concentrations circulantes de ghréline (Flanagan et al., 2003). Les taux de carboxylestérase et d'insuline sont maximaux chez les rats nourris, par conséquent, la dégradation de la forme active de la ghréline est très probablement accentuée. Il est possible que chez ces animaux nourris, l'effet orexigène de la ghréline sur les astrocytes glomérulaires soit très court et déjà aboli au bout d'une heure. Nos observations et analyses du comportement alimentaire des rats, suite à l'injection, vont dans ce sens. En effet, le détail de la prise alimentaire des rats durant l'heure de mise en présence de nourriture (résultats non présentés) montre que les rats nourris injectés à la ghréline augmentent leur prise alimentaire seulement dans les 15 premières minutes suivant l'injection. Dans ce contexte, les expérimentations *ex vivo*, que nous avons réalisées sont particulièrement intéressantes puisqu'elles permettent de s'affranchir des nombreuses boucles de régulations, et notamment de dégradation de la ghréline.

Nous n'avons pas étudié l'effet du NPY sur la morphologie des astrocytes glomérulaires par injections *in vivo*, mais uniquement au niveau local par application directe sur tranche de BO (*ex vivo*). Les données de la littérature sur le niveau de NPY plasmatique en situation de satiété et de jeûne sont en effet assez contradictoires. S'il est bien établi que la ghréline stimule la libération de NPY dans le noyau arqué, l'arrivée et les variations de la concentration de ce neuropeptide au niveau du système olfactif restent encore mal connues, alors même que le BO a la particularité de contenir l'un des plus hauts niveaux d'expression de l'ARNm du NPY dans le cerveau (Blakemore et al., 2006; Larhammar et al., 1987; Rutkoski et al., 1999). Par conséquent, des injections de NPY intra-péritonéales chez le rat nourri n'auraient pas été pertinentes pour mimer un état de jeûne, chez ces animaux. Il faudrait sans doute avoir recours à des injections intra-cérébro-ventriculaires, comme cela a été fait pour les orexines (Prud'homme et al 2009). Il serait intéressant de comparer l'expression du NPY au niveau du BO entre des rats nourris, des rats à jeun et des rats nourris injectés avec de la ghréline, afin de mieux comprendre sa régulation au niveau du BO.

En accord avec le rôle connu de la ghréline au niveau du noyau arqué, l'injection de ghréline, chez les rats nourris, a augmenté le niveau d'expression de NPY au niveau hypothalamique. Plusieurs études montrent que ces deux peptides orexigènes modulent également l'activité des neurones du système

olfactif. Au niveau de la MO, l'application de NPY et de ghréline dans la cavité nasale, augmente globalement la réactivité des circuits olfactifs en augmentant les réponses des neurones olfactifs aux odeurs (Doyle et al., 2008; Negroni et al., 2012) et le nombre de neurones olfactifs activés (Loch et al., 2015). Dans le BO, le NPY réduit, *in vitro*, l'activité spontanée excitatrice de certains neurones péri-glomérulaires excitateurs (les neurones péri-glomérulaires à axone courts) impliqués notamment dans l'activation des neurones péri-glomérulaires inhibiteurs (Blakemore et al., 2006). La ghréline augmente, quant à elle, le nombre de neurones péri-glomérulaires activés autour du glomérule correspondant à l'odeur présentée (Loch et al., 2015). Ces observations mettent en évidence, l'implication du NPY et de la ghréline dans la régulation de la transmission synaptique glomérulaire entre les neurones olfactifs et les cellules mitrales, (*via* une action neuronale et/ou astrocytaire) allant dans le sens d'une amplification du signal olfactif.

Dans les glomérules, les astrocytes sont directement en contact avec les neurones péri-glomérulaires et les cellules mitrales dans le compartiment non-sensoriel (Chao et al., 1997b). De ce fait, l'augmentation du déploiement astrocytaire dans les glomérules, en présence de NPY ou de ghréline, pourrait résulter de, ou induire, l'augmentation de l'activité neuronale dans les glomérules. En effet, les processus de plasticité morphologiques astrocytaires, décrits dans d'autres structures cérébrales, montrent que l'activité synaptique, notamment *via* le glutamate, induit d'importantes modifications morphologiques astrocytaires. Dans le NSO, des modifications expérimentales dans la libération du glutamate au niveau des terminaisons rétinienne induisent des changements drastiques dans la plasticité morphologique des astrocytes du NSO. *In vitro*, l'application de glutamate induit un allongement rapide des PAPs (Cornell-Bell et al., 1990; Hansson et al., 1994; Noble et al., 1992).

Compte tenu de l'action du NPY et de la ghréline sur l'activité des neurones glomérulaires, nous avons cherché à définir si l'augmentation du déploiement astrocytaire dans les glomérules résultait d'une action directe de ces peptides orexigènes sur les astrocytes ou indirecte *via* une activation synaptique glomérulaire. Nos résultats montrent, que lorsque l'on supprime l'activité synaptique (par du TTX) on abolit le déploiement astrocytaire induit par le NPY. Il est donc possible qu'en absence d'activité synaptique, le NPY n'ait plus d'effet sur la morphologie des astrocytes glomérulaires. Cela suggère que le NPY agirait indirectement sur le déploiement astrocytaire *via* l'activation des neurones glomérulaires. Ces conclusions restent hypothétiques, d'une part parce que ce sont des résultats préliminaires qui restent à confirmer, et d'autre part parce que l'utilisation du TTX pour inhiber l'activité synaptique peut être critiquable. En effet, le TTX est un inhibiteur des canaux sodiques voltage-dépendants, couramment utilisé pour inhiber l'activité synaptique. Or, cette toxine est également capable de supprimer partiellement (environ 60% avec 1.10^{-8} M de TTX) ou totalement (avec 1.10^{-7} M de TTX) les courants sodiques astrocytaires, en inhibant l'activité des pompes Na^+/K^+

ATPase astrocytaires (Kirischuk et al., 2012; Sontheimer et al., 1994; Waxman, 2003). Ces pompes sont impliquées dans l'élimination de l'excès du potassium extracellulaire libéré lors d'une activité neuronale. L'inhibition du recyclage du potassium de la fente synaptique par les astrocytes conduit à l'excitotoxicité des neurones et, à long-terme, à la mort des astrocytes (Kirischuk et al., 2012; Sontheimer et al., 1994). Dans notre étude, nous avons utilisé le TTX à une concentration de 1.10^{-5} M conduisant probablement à des perturbations fonctionnelles des astrocytes. L'absence de pompes sodiques potassiques fonctionnelles pourrait avoir impacté les mécanismes de plasticité morphologique astrocytaire. Il a d'ailleurs été montré, *in vitro*, que des niveaux élevés de potassium stimulent la formation de nouveaux prolongements astrocytaires (Reichelt et al., 1989). Dans ces conditions, l'ajout du TTX en présence de NPY pourrait, indépendamment de l'activité neuronale, inhiber l'augmentation du déploiement astrocytaire. Il est donc difficile de conclure sur l'effet direct ou indirect du NPY sur le déploiement astrocytaire dans les glomérules. Cependant, nos premiers résultats sur des cultures primaires d'astrocytes du BO montrent un effet stimulant du NPY sur l'émission des PAPs (marquage ezrine ; Figure 92 et 93 ; G. CHAMPEIL-POTOKAR), qui va dans le sens d'un effet direct du NPY sur les astrocytes du BO.

La motilité des PAPs peut être régulée par le glutamate libéré dans la fente synaptique *via* l'activation des mGluRs au niveau des PAPs (Bernardinelli et al., 2014; Lavielle et al., 2011) et une augmentation transitoire du Ca^{2+} intracellulaire astrocytaire (Bernardinelli et al., 2014). Afin de préciser si l'augmentation de l'activité neuronale dans les glomérules, en situation de jeûne, est un effecteur de déploiement astrocytaire, nous avons étudié la signalisation calcique astrocytaire et la morphologie des astrocytes glomérulaires en réponse à une activation de leurs récepteurs métabotropiques au glutamate (mGluRs).

En réponse à un changement d'activité neuronale, la libération de glutamate est détectée par les transporteurs et récepteurs du glutamate astrocytaires qui génèrent un influx calcique proportionnel. L'analyse de la signalisation calcique astrocytaire aurait donc été une bonne approche pour définir si l'augmentation du déploiement astrocytaire, en présence de peptides orexigènes, passe par une activation neuronale. Malheureusement, malgré de nombreux essais de mises au point, nous n'avons pas pu analyser la signalisation calcique des astrocytes du BO. Dans les glomérules, cette signalisation calcique se localise probablement au niveau des PAPs astrocytaires, donc dans des compartiments cytoplasmiques extrêmement fins, difficilement analysables en microscopie optique, et met en jeu de faibles variations de la concentration calcique, difficiles à mesurer, et ceci d'autant plus dans un modèle rat, sur lequel toute notre étude a été développée, mais qui ne permet pas d'identification *a priori* des astrocytes (à la différence des souris transgéniques). Il serait très intéressant de refaire ces analyses en utilisant les nouvelles sondes

calciques récemment mises au point (comme le CaRuby-Nano) qui sont beaucoup plus sensibles à de faibles fluctuations calciques (Collot et al., 2015), permettent l'observation au niveau des PAPs glomérulaires (Otsu et al., 2014), et offrent l'avantage de pouvoir être utilisées par transfection virale ou via la construction d'une lignée stable de souris transgéniques (Collot et al., 2015).

L'activité glutamatergique augmente l'élongation des PAPs astrocytaires *via* l'activation des mGluRs astrocytaires (Bernardinelli et al., 2014; Lavialle et al., 2011). Nos résultats montrent que le tACPD, agoniste des mGluRs, n'a pas d'effet sur le déploiement astrocytaire dans les glomérules, ce qui suggère que l'augmentation du déploiement astrocytaire dans les glomérules ne passe pas par l'activation des mGluRs. Cependant, l'utilisation du tACPD pour mimer une activation neuronale ne permet pas de mesurer l'impact potentiel de l'activité synaptique *via* d'autres facteurs libérés dans la fente synaptique (potassium extracellulaire, ATP, GABA, ...) et susceptibles d'induire une plasticité astrocytaire.

En l'état, nos résultats ne nous permettent pas de savoir si l'augmentation de l'activité neuronale, observée dans le BO en situation de jeûne et en présence de peptides orexigènes (Palouzier-Paulignan et al., 2012), est un effecteur de l'augmentation du déploiement astrocytaire dans les glomérules.

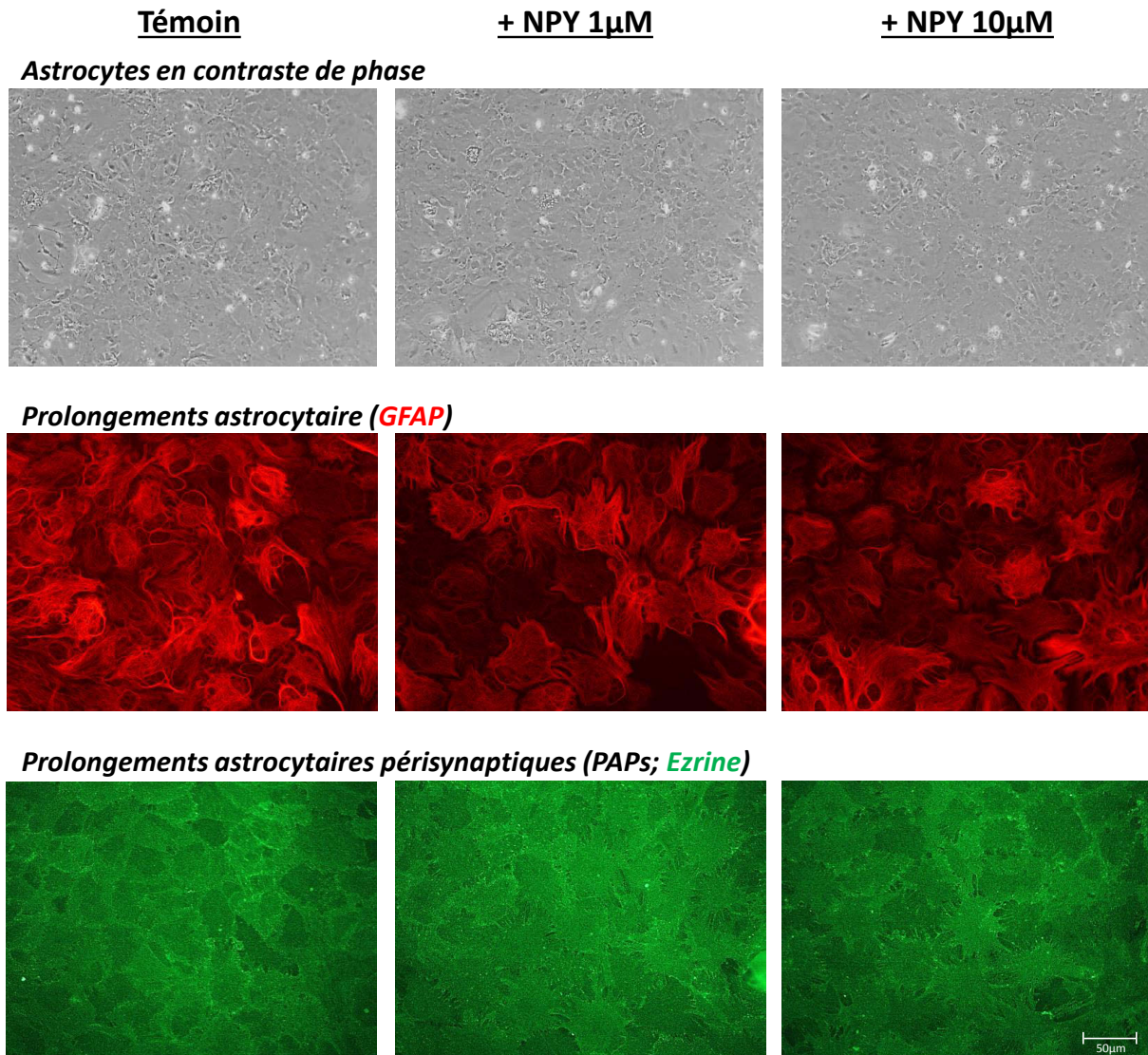


Figure 92 : Effet du NPY sur la plasticité morphologique d'astrocytes du BO en culture primaire (Gaëlle CHAMPEIL-POTOKAR)

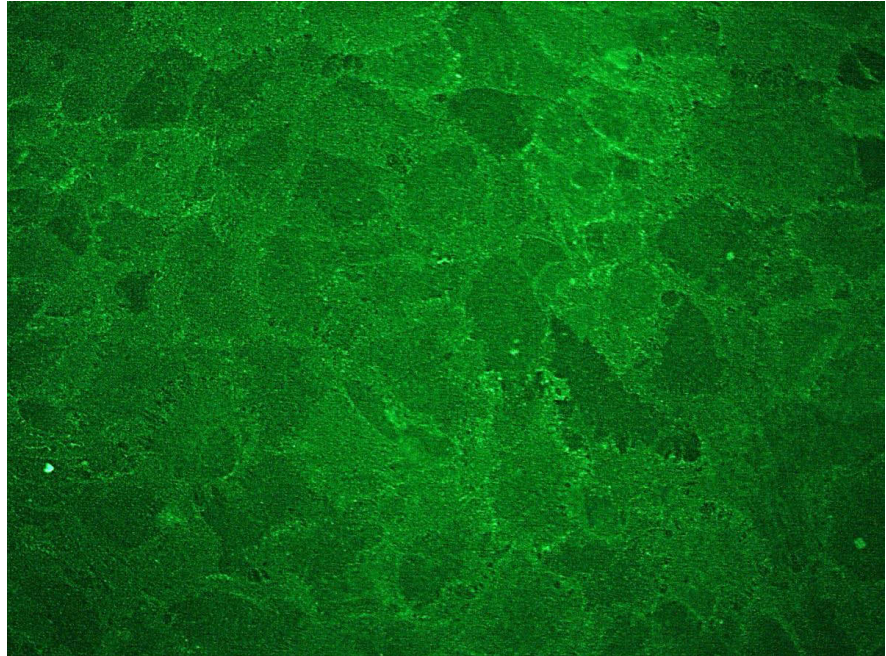
Culture primaire d'astrocytes de BO témoins (colonne de gauche) ou incubés en présence de NPY 1 μ M (colonne du milieu) ou 10 μ M (colonne de droite) pendant 72h.

Marquage immunohistochimique des prolongements astrocytaires périssynaptiques (PAPs) marqués par l'eitrine non phosphorylée (vert), des prolongements astrocytaires marqués par la GFAP (rouge).

Les résultats préliminaires montrent une augmentation de l'émission de PAPs (marquage ezrine) induite par le NPY, comme cela est illustré à plus fort grossissement par les deux images de la figure 93.

Astrocytes en culture immunomarqués par l'ézrine

Témoin



+ NPY 10 μ M-72h

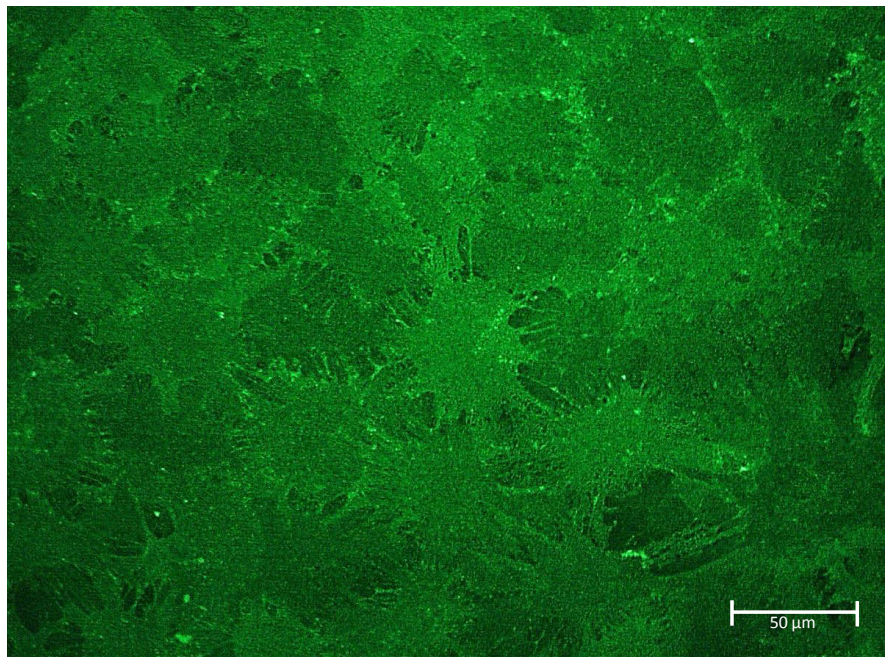


Figure 93: Effet du NPY sur la plasticité morphologique des PAPs d'astrocytes du BO en culture primaire (Gaëlle CHAMPEIL-POTOKAR)

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Conclusion et perspectives

Notre étude montre qu'un jeûne de 17h entraîne une augmentation du déploiement astrocytaire (+44% en moyenne) dans l'ensemble des glomérules du bulbe olfactif, comparativement à des rats rassasiés. Cette augmentation s'atténue avec des durées de jeûne plus stressantes (24h et 48h). L'augmentation du déploiement des astrocytes, principalement associés à l'environnement synaptique non-sensoriel des cellules mitrales accentue les régulations astrocytaires dans ces zones. Dans ce contexte, l'augmentation de la présence astrocytaire pourrait faire barrière aux régulations inhibitrices que les neurones péri-glomérulaires et les fibres centrifuges exercent sur les cellules mitrales, favorisant ainsi l'activation des cellules mitrales par les neurones olfactifs, stimulée en situation de jeûne, dans plusieurs études (Apelbaum et al., 2005; Pager et al., 1972), et associée à une augmentation de sensibilité olfactive (Aimé et al., 2007). Les astrocytes participeraient ainsi activement à l'amplification du signal olfactif, en situation de jeûne, améliorant les capacités olfactives des individus en recherche de nourriture et préparant à la prise alimentaire.

Nous montrons également que l'augmentation du déploiement astrocytaire observée en situation de jeûne peut être réversée, chez des animaux à jeun, par le rétablissement de la glycémie ou l'injection du peptide anorexigène PYY3-36, facteur métabolique de satiété. Lorsque nous appliquons le PYY3-36 directement sur des tranches de BO, nous observons une rétraction des prolongements astrocytaires dans les glomérules, ce qui suggère une action directe de ce peptide anorexigène sur les astrocytes en situation de satiété. A l'inverse, l'application directe des peptides orexigènes ghréline et NPY sur des tranches de BO entraîne une augmentation du déploiement astrocytaire dans les glomérules. Le déploiement astrocytaire qui varie au sein des glomérules du BO en fonction du statut métabolique des rats est donc contrôlé par les peptides impliqués dans la régulation de la prise alimentaire, comme le PYY3-36, le NPY et la ghréline. En revanche, nos résultats ex vivo, montrent qu'il est peu probable que les variations de la glycémie soient directement impliquées dans les modifications morphologiques des astrocytes glomérulaires, mais elles pourraient y contribuer en activant des voies orexigènes ou anorexigènes et les peptides qui y participent.

Les peptides orexigènes et anorexigènes ont donc des effets inverses sur la morphologie des astrocytes glomérulaires, et leurs effets respectifs sont en accord avec les variations du déploiement astrocytaire observées au cours du jeûne ou après rassasiement.

En situation de satiété, le niveau des peptides anorexigènes tels que PYY3-36 sont élevés, ce qui permet d'inhiber la prise alimentaire au niveau hypothalamique. Nos résultats montrent que le PYY3-36 entraîne la rétraction des prolongements astrocytaires dans les glomérules du BO favorisant

potentiellement les régulations inhibitrices qui s'exercent sur les cellules mitrales, augmentant ainsi le contrôle central de la sensibilité olfactive (Aimé et al., 2007). En situation de jeûne, le niveau des peptides orexigènes tels que NPY ou la ghréline sont élevés et stimulent la prise alimentaire au niveau hypothalamique. Ces peptides entraînent une augmentation du déploiement astrocytaire dans les glomérules du BO libérant ainsi les cellules mitrales de nombreuses terminaisons modulatrices, ce qui peut permettre une augmentation de la sensibilité olfactive (Aimé et al., 2007).

Les peptides orexigènes et anorexigènes régulent la prise alimentaire par leur action centrale au niveau hypothalamique et par la régulation sensorielle de la prise alimentaire, en modulant notamment la sensibilité des circuits olfactifs (Palouzier-Paulignan et al., 2012). A ce niveau, nous montrons que leur action consiste notamment à moduler la morphologie des astrocytes glomérulaires (figure 94). La voie d'action par laquelle ces peptides modulent la morphologie astrocytaire dans les glomérules reste encore incertaine. Nos résultats plaident pour une action directe de certains de ces peptides sur les astrocytes. Mais ils ne permettent pas, à ce stade, d'exclure une participation de l'activité neuronale glomérulaire elle-même dans cette plasticité astrocytaire. La poursuite de notre étude, de l'implication d'une activation neuronale, sur des cultures primaires d'astrocytes de BO (*in vitro*) et sur tranches de BO (*ex vivo*), en ciblant en particulier les différents récepteurs métabotropiques des astrocytes aux neurotransmetteurs, permettra d'avancer sur ces mécanismes. Il sera également intéressant de compléter nos résultats en étudiant l'effet d'autres peptides orexigènes/anorexigènes impliqués dans la régulation de la prise alimentaire (CCK, GLP-1, orexines, insuline ...). La plupart de ces peptides ayant déjà été montrés comme pouvant moduler la sensibilité des circuits olfactifs (Palouzier-Paulignan et al., 2012), cela fait d'eux des effecteurs potentiels de la plasticité morphologique astrocytaire dans le BO en situation de jeûne ou de satiété.

Nos travaux mettent en évidence une méta-régulation astrocytaire au niveau du bulbe olfactif jouant potentiellement un rôle clé dans l'adaptation de la sensibilité olfactive à l'état métabolique. A l'instar de ce qui a été observé dans les noyaux supra-optiques et supra-chiasmiques, nous montrons ainsi une nouvelle implication de la plasticité morphologique astrocytaire dans l'élaboration d'une plasticité de la neurotransmission, permettant de faire le lien entre un état physiologique (métabolique) et l'efficacité d'une réponse neuronale (signal olfactif).

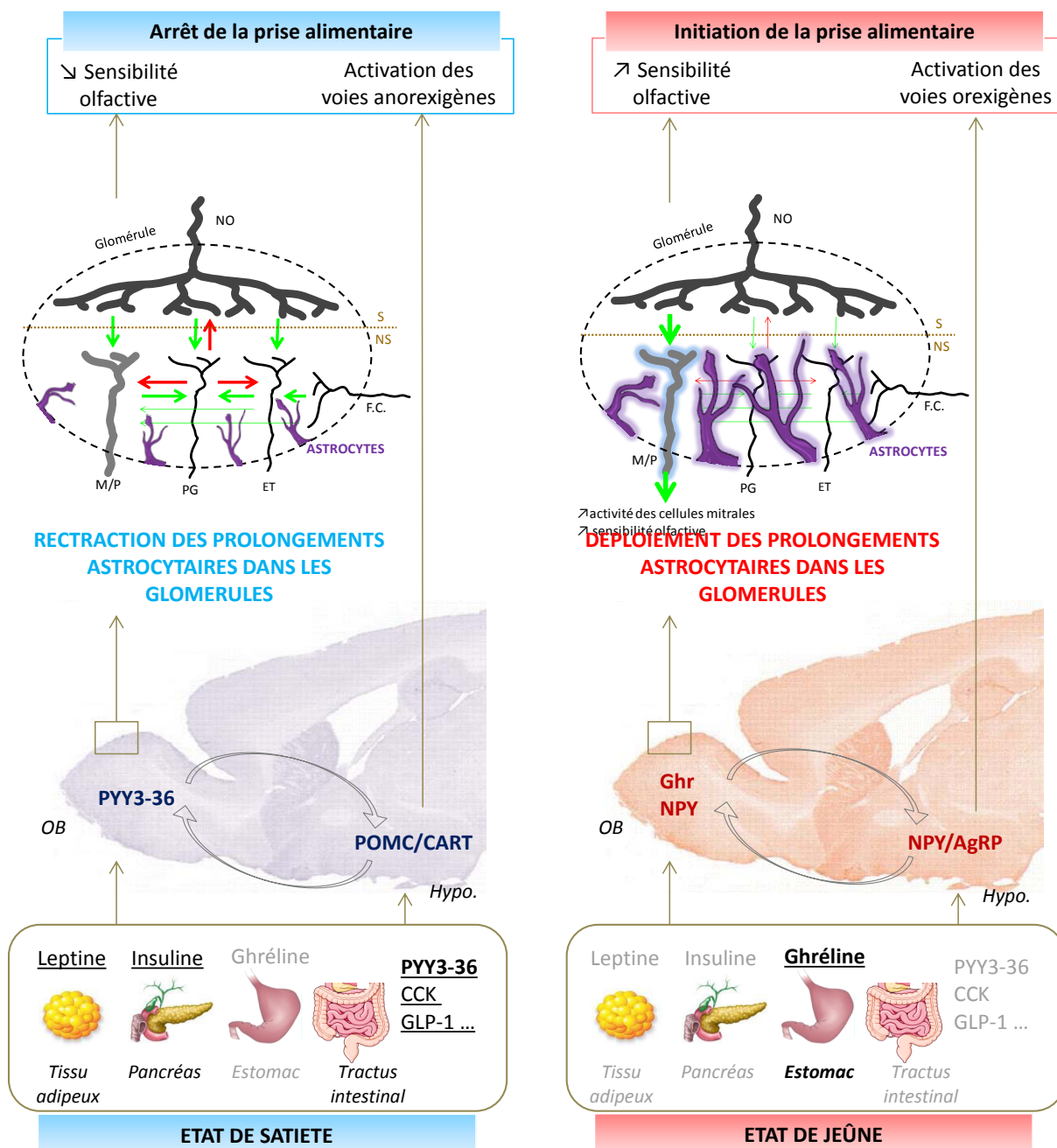


Figure 94: Plasticité morphologique des astrocytes glomérulaires du bulbe olfactif chez le rat: rôle dans la relation entre olfaction et prise alimentaire

En situation de satiété (gauche), les concentrations des peptides anorexigènes tels que PYY3-36 sont maximales, ce qui active la voie anorexigène au niveau hypothalamique entraînant l'arrêt de la prise alimentaire. Parallèlement, leur action au niveau du BO entraîne la rétraction des prolongements astrocytaires, favorisant ainsi les régulations inhibitrices qui s'exercent sur les cellules mitrales ce qui a pour conséquence une diminution de la sensibilité olfactive.

En situation de jeûne (droite), les concentrations des peptides ou neuropeptides orexigènes, tels que NPY ou la ghréline, sont maximales et stimulent la prise alimentaire au niveau hypothalamique grâce à l'activation de la voie orexigène. Parallèlement, leur action au niveau du BO, entraîne une augmentation du déploiement astrocytaire, libérant ainsi les cellules mitrales des influences inhibitrices, ce qui a pour conséquence une augmentation de la sensibilité olfactive.

Abréviations: OB: Bulbe olfactif; NPY: Neuropeptide Y; AgRP: Agouti-related protein; POMC: Pro-Opiomélancortine; CART: Cocaïne- and Amphetamine-Regulated Transcript; Ghrelin: Ghréline; Hypo: Hypothalamus; NO: Neurone olfactif; M/P: Cellules mitrales et à panaches; PG: Neurone périglomérulaire inhibiteur; ET: Neurone à panache externe (neurone périglomérulaire excitateur); F.C.: Projection des fibres centrifuges noradrénergiques, sérotoninergiques et cholinergiques; S: Compartiment sensoriel; NS: Compartiment non-sensoriel.

Cette plasticité morphologique astrocytaire au sein du bulbe olfactif, ouvre aussi des pistes mécanistiques pour comprendre comment l'état métabolique (faim/satiété) est capable d'influencer notre détection olfactive.

Il sera intéressant de poursuivre ces travaux en étudiant plus précisément les conséquences fonctionnelles d'une telle plasticité morphologique astrocytaire sur la transmission du signal olfactif. Le déploiement astrocytaire est-il un accompagnateur ou un élément causal de l'augmentation de la sensibilité olfactive associée au jeûne ? Pour avancer sur ce point, il serait intéressant de mettre en place des études électrophysiologiques afin d'enregistrer l'activité électrique des cellules mitrales en fonction du déploiement astrocytaire glomérulaire modulé par l'application d'effecteurs stimulant le déploiement ou la rétraction astrocytaire, ou d'inhibiteurs spécifiques de l'activité astrocytaire.

Il serait également intéressant de pouvoir identifier plus précisément le(s) système(s) modulateur(s) affecté(s) par cette plasticité astrocytaire : les cellules périglomérulaires, les afférences centrifuges glutamatergiques, sérotoninergiques, noradrénergiques, cholinergiques, ou bien les afférences neuropeptidergiques en provenance de l'hypothalamus. Pour avancer sur ce point, l'utilisation de la microscopie électronique permettrait de caractériser précisément les synapses glomérulaires impactées par les variations morphologiques astrocytaires, chez des animaux à jeun ou nourris.

Parmi les afférences centrifuges des glomérules du BO, les arrivées des fibres sérotoninergiques sont particulièrement intéressantes, car le système sérotoninergique est impliqué à la fois dans la régulation anorexigène de la prise alimentaire (Harrold et al., 2012) et dans la régulation du système olfactif en participant à la mise en place des processus de discrimination et d'apprentissage des odeurs (Matsutani et al., 2008). *In vivo*, la déplétion des fibres centrifuges sérotoninergiques du BO par injection de neurotoxines comme la dihydroxytryptamine (Moriizumi et al., 1994) ou la mise en place d'approches d'optogénétiques permettant de stimuler spécifiquement les afférences sérotoninergiques du raphé vers le BO (Brunert et al., 2016), permettrait d'étudier plus précisément l'implication des stimulations sérotoninergiques glomérulaires dans la modulation du déploiement astrocytaire.

Concernant les applications en nutrition/santé, nos résultats permettent de considérer la plasticité astrocytaire dans les glomérules comme un marqueur de la satiété olfactive en lien avec l'état métabolique. Ce marqueur constitue un outil intéressant pour étudier les altérations de la régulation sensorielle de la prise alimentaire, impliquées dans les situations obésogènes (déséquilibres alimentaires, stress, sédentarité). L'étude de la plasticité morphologique des astrocytes glomérulaires dans des situations métaboliques perturbées (régimes trop riches en lipides, sucres, protéines) est actuellement en cours au laboratoire ; l'objectif est d'utiliser ce marqueur pour savoir

si l'adaptation du système olfactif à la régulation énergétique de l'organisme est fonctionnelle ou altérée. Nos travaux fournissent donc un outil précieux pour évaluer les altérations d'une composante importante de la régulation hédonique de la prise alimentaire : la satiété olfactive.

BIBLIOGRAPHIE

Bibliographie

A

Abbott, C.R., Rossi, M., Wren, A.M., Murphy, K.G., Kennedy, A.R., Stanley, S.A., Zollner, A.N., Morgan, D.G.A., Morgan, I., Ghatei, M.A., et al. (2001). Evidence of an Orexigenic Role for Cocaine- and Amphetamine-Regulated Transcript after Administration into Discrete Hypothalamic Nuclei. *Endocrinology* *142*, 3457–3463.

Abbott, C.R., Kennedy, A.R., Wren, A.M., Rossi, M., Murphy, K.G., Seal, L.J., Todd, J.F., Ghatei, M.A., Small, C.J., and Bloom, S.R. (2003). Identification of Hypothalamic Nuclei Involved in the Orexigenic Effect of Melanin-Concentrating Hormone. *Endocrinology* *144*, 3943–3949.

Abbott, N.J., Patabendige, A.A.K., Dolman, D.E.M., Yusof, S.R., and Begley, D.J. (2010). Structure and function of the blood–brain barrier. *Neurobiol. Dis.* *37*, 13–25.

Abizaid, A., Liu, Z.-W., Andrews, Z.B., Shanabrough, M., Borok, E., Elsworth, J.D., Roth, R.H., Sleeman, M.W., Picciotto, M.R., Tschöp, M.H., et al. (2006). Ghrelin modulates the activity and synaptic input organization of midbrain dopamine neurons while promoting appetite. *J. Clin. Invest.* *116*, 3229–3239.

Ache, B.W., and Young, J.M. (2005). Olfaction: Diverse Species, Conserved Principles. *Neuron* *48*, 417–430.

Agulhon, C., Fiacco, T.A., and McCarthy, K.D. (2010). Hippocampal Short- and Long-Term Plasticity Are Not Modulated by Astrocyte Ca²⁺ Signaling. *Science* *327*, 1250–1254.

Ahima, R.S., and Osei, S.Y. (2004). Leptin signaling. *Physiol. Behav.* *81*, 223–241.

Aimé, P., Palouzier-Paulignan, B., Salem, R., Al Koborssy, D., Garcia, S., Duchamp, C., Romestaing, C., and Julliard, A.K. (2014). Modulation of olfactory sensitivity and glucose-sensing by the feeding state in obese Zucker rats. *Front. Behav. Neurosci.* *8*.

Aimé, P., Duchamp-Viret, P., Chaput, M.A., Savigner, A., Mahfouz, M., and Julliard, A.K. (2007). Fasting increases and satiation decreases olfactory detection for a neutral odor in rats. *Behav. Brain Res.* *179*, 258–264.

Aimé, P., Hegoburu, C., Jaillard, T., Degletagne, C., Garcia, S., Messaoudi, B., Thevenet, M., Lorsignol, A., Duchamp, C., Mouly, A.-M., et al. (2012). 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.

Al Koborssy, D., Palouzier-Paulignan, B., Salem, R., Thevenet, M., Romestaing, C., and Julliard, A.K. (2014a). Cellular and molecular cues of glucose sensing in the rat olfactory bulb. *Front. Neurosci.* *8*.

Al Koborssy, D., Palouzier-Paulignan, B., Salem, R., Thevenet, M., Romestaing, C., and Julliard, A.K. (2014b). Cellular and molecular cues of glucose sensing in the rat olfactory bulb. *Front. Neurosci.* *8*.

Albrecht, J., Schreder, T., Kleemann, A.M., Schöpf, V., Kopietz, R., Anzinger, A., Demmel, M., Linn, J., Kettenmann, B., and Wiesmann, M. (2009). Olfactory detection thresholds and pleasantness of a food-related and a non-food odour in hunger and satiety. *Rhinology* *47*, 160–165.

Amédée, T., Robert, A., and Coles, J.A. (1997). Potassium homeostasis and glial energy metabolism. *Glia* 21, 46–55.

Amiry-Moghaddam, M., and Ottersen, O.P. (2003). The molecular basis of water transport in the brain. *Nat. Rev. Neurosci.* 4, 991–1001.

Anand, B.K., Chhina, G.S., Sharma, K.N., Dua, S., and Singh, B. (1964). ACTIVITY OF SINGLE NEURONS IN THE HYPOTHALAMIC FEEDING CENTERS: EFFECT OF GLUCOSE. *Am. J. Physiol.* 207, 1146–1154.

Anderova, M., Benesova, J., Mikesova, M., Dzamba, D., Honsa, P., Kriska, J., Butenko, O., Novosadova, V., Valihrach, L., Kubista, M., et al. (2014). Altered Astrocytic Swelling in the Cortex of α -Syntrophin-Negative GFAP/EGFP Mice. *PLoS ONE* 9, e113444.

Andriezen, W.L. (1893). The Neuroglia Elements in the Human Brain. *Br. Med. J.* 2, 227–230.

Apelbaum, A.F. (2003). Rats Habituated to Chronic Feeding Restriction Show a Smaller Increase in Olfactory Bulb Reactivity Compared to Newly Fasted Rats. *Chem. Senses* 28, 389–395.

Apelbaum, A.F., Perrut, A., and Chaput, M. (2005a). Orexin A effects on the olfactory bulb spontaneous activity and odor responsiveness in freely breathing rats. *Regul. Pept.* 129, 49–61.

Apelbaum, A.F., Perrut, A., and Chaput, M. (2005b). Orexin A effects on the olfactory bulb spontaneous activity and odor responsiveness in freely breathing rats. *Regul. Pept.* 129, 49–61.

Appaix, F., Girod, S., Boisseau, S., Römer, J., Vial, J.-C., Albrieux, M., Maurin, M., Depaulis, A., Guillemain, I., and van der Sanden, B. (2012). Specific In Vivo Staining of Astrocytes in the Whole Brain after Intravenous Injection of Sulforhodamine Dyes. *PLoS ONE* 7, e35169.

Araque, A., Parpura, V., Sanzgiri, R.P., and Haydon, P.G. (1999). Tripartite synapses: glia, the unacknowledged partner. *Trends Neurosci.* 22, 208–215.

Araque, A., Carmignoto, G., Haydon, P.G., Oliet, S.H.R., Robitaille, R., and Volterra, A. (2014). Gliotransmitters Travel in Time and Space. *Neuron* 81, 728–739.

Argente-Arizona, P., Guerra-Cantera, S., Garcia-Segura, L.M., Argente, J., and Chowen, J.A. (2016). Glial cells and energy balance. *J. Mol. Endocrinol.* JME-16-0182.

Astic, L., Saucier, D., Coulon, P., Lafay, F., and Flamand, A. (1993). The CVS strain of rabies virus as transneuronal tracer in the olfactory system of mice. *Brain Res.* 619, 146–156.

B

Bado, A., Levasseur, S., Attoub, S., Kermorgant, S., Laigneau, J.P., Bortoluzzi, M.N., Moizo, L., Lehy, T., Guerre-Millo, M., Le Marchand-Brustel, Y., et al. (1998). The stomach is a source of leptin. *Nature* 394, 790–793.

Badonnel, K., Durieux, D., Monnerie, R., Grébert, D., Salesse, R., Caillol, M., and Baly, C. (2009). Leptin-sensitive OBP-expressing mucous cells in rat olfactory epithelium: a novel target for olfaction-nutrition crosstalk? *Cell Tissue Res.* 338, 53–66.

- Bai FL, Yamano M, Shiotani Y, Emson PC, Smith AD, Powell JF, Tohyama M (1985) An arcuato-paraventricular and -dorsomedial hypothalamic neuropeptide Y-containing system which lacks noradrenaline in the rat. *Brain Res* 331:172-175.
- Baier, P.C., Weinhold, S.L., Huth, V., Gottwald, B., Ferstl, R., and Hinze-Selch, D. (2008). Olfactory dysfunction in patients with narcolepsy with cataplexy is restored by intranasal Orexin A (Hypocretin-1). *Brain* 131, 2734–2741.
- Bailey, M.S., and Shipley, M.T. (1993). Astrocyte subtypes in the rat olfactory bulb: Morphological heterogeneity and differential laminar distribution. *J. Comp. Neurol.* 328, 501–526.
- Balfour, R.H., Hansen, A.M.K., and Trapp, S. (2006). Neuronal responses to transient hypoglycaemia in the dorsal vagal complex of the rat brainstem: Brainstem glucosensors. *J. Physiol.* 570, 469–484.
- Baly, C., Aioun, J., Badonnel, K., Lacroix, M.-C., Durieux, D., Schlegel, C., Salesse, R., and Caillol, M. (2007). Leptin and its receptors are present in the rat olfactory mucosa and modulated by the nutritional status. *Brain Res.* 1129, 130–141.
- Banks, W.A., Kastin, A.J., and Pan, W. (1999). Uptake and degradation of blood-borne insulin by the olfactory bulb. *Peptides* 20, 373–378.
- Baquedano, E., Chowen, J.A., Argente, J., and Frago, L.M. (2013). Differential effects of GH and GH-releasing peptide-6 on astrocytes. *J. Endocrinol.* 218, 263–274.
- Barnea, A., Aguila-Mansilla, N., Bigio, E.H., Carolyn Worby, and Roberts, J. (1998). Evidence for regulated expression of neuropeptide Y gene by rat and human cultured astrocytes. *Regul. Pept.* 75–76, 293–300.
- Barone, F.C., Wayner, M.J., Scharoun, S.L., Guevara-Aguilar, R., and Aguilar-Baturoni, H.U. (1981). Afferent connections to the lateral hypothalamus: a horseradish peroxidase study in the rat. *Brain Res. Bull.* 7, 75–88.
- Baskin, D.G., Porte, D., Guest, K., and Dorsa, D.M. (1983). Regional Concentrations of Insulin in the Rat Brain*. *Endocrinology* 112, 898–903.
- Batterham, R.L., Cowley, M.A., Small, C.J., Herzog, H., Cohen, M.A., Dakin, C.L., Wren, A.M., Brynes, A.E., Low, M.J., Ghatei, M.A., et al. (2002). Gut hormone PYY(3-36) physiologically inhibits food intake. *Nature* 418, 650–654.
- Batterham, R.L., Cohen, M.A., Ellis, S.M., Le Roux, C.W., Withers, D.J., Frost, G.S., Ghatei, M.A., and Bloom, S.R. (2003). Inhibition of Food Intake in Obese Subjects by Peptide YY₃₋₃₆. *N. Engl. J. Med.* 349, 941–948.
- Batterham, R.L., Cowley, M.A., Small, C.J., Herzog, H., Cohen, M.A., Dakin, C.L., Wren, A.M., Brynes, A.E., Low, M.J., Ghatei, M.A., et al. (2004). Physiology: Does gut hormone PYY₃₋₃₆ decrease food intake in rodents? (reply). *Nature* 430.
- Beck, B. (2006). Neuropeptide Y in normal eating and in genetic and dietary-induced obesity. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 361, 1159–1185.
- Becquet, D., Girardet, C., Guillaumond, F., François-Bellan, A.-M., and Bosler, O. (2008). Ultrastructural plasticity in the rat suprachiasmatic nucleus. Possible involvement in clock entrainment. *Glia* 56, 294–305.

- Bellisle, F. (2005). Nutrition and Health in France: Dissecting a Paradox. *J. Am. Diet. Assoc.* *105*, 1870–1873.
- Benfenati, V., and Ferroni, S. (2010). Water transport between CNS compartments: functional and molecular interactions between aquaporins and ion channels. *Neuroscience* *168*, 926–940.
- Bermudez-Silva, F.J., Viveros, M.P., McPartland, J.M., and Rodriguez de Fonseca, F. (2010). The endocannabinoid system, eating behavior and energy homeostasis: The end or a new beginning? *Pharmacol. Biochem. Behav.* *95*, 375–382.
- Bernardinelli, Y., Magistretti, P.J., and Chatton, J.-Y. (2004). Astrocytes generate Na⁺-mediated metabolic waves. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *101*, 14937–14942.
- Bernardinelli, Y., Randall, J., Janett, E., Nikonenko, I., König, S., Jones, E.V., Flores, C.E., Murai, K.K., Bochet, C.G., Holtmaat, A., et al. (2014). Activity-Dependent Structural Plasticity of Perisynaptic Astrocytic Domains Promotes Excitatory Synapse Stability. *Curr. Biol.* *24*, 1679–1688.
- Berridge, K.C., Robinson, T.E., and Aldridge, J.W. (2009). Dissecting components of reward: “liking”, “wanting”, and learning. *Curr. Opin. Pharmacol.* *9*, 65–73.
- Berthoud, H.-R. (2006). Homeostatic and Non-homeostatic Pathways Involved in the Control of Food Intake and Energy Balance. *Obesity* *14*, 197S–200S.
- Biju, K.C., Marks, D.R., Mast, T.G., and Fadool, D.A. (2008). Deletion of voltage-gated channel affects glomerular refinement and odorant receptor expression in the mouse olfactory system. *J. Comp. Neurol.* *506*, 161–179.
- Bjørbaek, C., Uotani, S., da Silva, B., and Flier, J.S. (1997). Divergent signaling capacities of the long and short isoforms of the leptin receptor. *J. Biol. Chem.* *272*, 32686–32695.
- Blakemore, L.J., Levenson, C.W., and Trombley, P.Q. (2006). Neuropeptide Y modulates excitatory synaptic transmission in the olfactory bulb. *Neuroscience* *138*, 663–674.
- Boesveldt, S., and Lundström, J.N. (2014). Detecting Fat Content of Food from a Distance: Olfactory-Based Fat Discrimination in Humans. *PLoS ONE* *9*, e85977.
- Bonfils, P., Norès, J.-M., Halimi, P., Avan, P., Le Bihan, C., and Landais, P. (2005). Correlation between Nasosinus Symptoms and Topographic Diagnosis in Chronic Rhinosinusitis. *Ann. Otol. Rhinol. Laryngol.* *114*, 74–83.
- Boudaba, C., Linn, D.M., Halmos, K.C., and Tasker, J.G. (2003). Increased tonic activation of presynaptic metabotropic glutamate receptors in the rat supraoptic nucleus following chronic dehydration. *J. Physiol.* *551*, 815–823.
- Bouna, S., Gysling, K., Calas, A., and Araneda, S. (1994). Some noradrenergic neurons of locus ceruleus-olfactory pathways contain neuropeptide-Y. *Brain Res. Bull.* *34*, 413–417.
- Boyd, A.M., Sturgill, J.F., Poo, C., and Isaacson, J.S. (2012). Cortical Feedback Control of Olfactory Bulb Circuits. *Neuron* *76*, 1161–1174.
- Brady, S., Lalli, P., Midha, N., Chan, A., Garven, A., Chan, C., and Toth, C. (2013). Presence of Neuropathic Pain May Explain Poor Performances on Olfactory Testing in Diabetes Mellitus Patients. *Chem. Senses* *38*, 497–507.

Bretscher, A., Edwards, K., and Fehon, R.G. (2002). ERM proteins and merlin: integrators at the cell cortex. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 3, 586–599.

Breunig, E., Czesnik, D., Piscitelli, F., Di Marzo, V., Manzini, I., and Schild, D. (2011). Endocannabinoid Modulation in the Olfactory Epithelium. In *Sensory and Metabolic Control of Energy Balance*, W. Meyerhof, U. Beisiegel, and H.-G. Joost, eds. (Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg), pp. 139–145.

Broberger, C., De Lecea, L., Sutcliffe, J.G., and Hökfelt, T. (1998). Hypocretin/orexin- and melanin-concentrating hormone-expressing cells form distinct populations in the rodent lateral hypothalamus: relationship to the neuropeptide Y and agouti gene-related protein systems. *J. Comp. Neurol.* 402, 460–474.

Brunert, D., Tsuno, Y., Rothermel, M., Shipley, M. T., & Wachowiak, M. (2016). Cell-type-specific modulation of sensory responses in olfactory bulb circuits by serotonergic projections from the raphe nuclei. *Journal of Neuroscience*, 36(25), 6820–6835.

Brüning, J.C., Gautam, D., Burks, D.J., Gillette, J., Schubert, M., Orban, P.C., Klein, R., Krone, W., Müller-Wieland, D., and Kahn, C.R. (2000). Role of brain insulin receptor in control of body weight and reproduction. *Science* 289, 2122–2125.

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

Burdakov, D., Luckman, S.M., and Verkhratsky, A. (2005). Glucose-sensing neurons of the hypothalamus. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 360, 2227–2235.

Bushong, E.A., Martone, M.E., and Ellisman, M.H. (2004a). Maturation of astrocyte morphology and the establishment of astrocyte domains during postnatal hippocampal development. *Int. J. Dev. Neurosci.* 22, 73–86.

Bushong, E.A., Martone, M.E., and Ellisman, M.H. (2004b). Maturation of astrocyte morphology and the establishment of astrocyte domains during postnatal hippocampal development. *Int. J. Dev. Neurosci.* 22, 73–86.

C

Cabanac M, Duclaux R. (1973). Alliesthésie olfacto-gustative et prise alimentaire chez l'homme. *J Physiol* 66:113–35

Cabanac, M. (1971). Physiological role of pleasure. *Science* 173, 1103–1107.

Cabanac, M. (1979). Sensory pleasure. *Q. Rev. Biol.* 54, 1–29.

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

Cameron, J.D., Goldfield, G.S., and Doucet, É. (2012). Fasting for 24h improves nasal chemosensory performance and food palatability in a related manner. *Appetite* 58, 978–981.

- Catalani, A., Sabbatini, M., Consoli, C., Cinque, C., Tomassoni, D., Azmitia, E., Angelucci, L., and Amenta, F. (2002). Glial fibrillary acidic protein immunoreactive astrocytes in developing rat hippocampus. *Mech. Ageing Dev.* *123*, 481–490.
- Chaigneau, E., Tiret, P., Lecoq, J., Ducros, M., Knopfel, T., and Charpak, S. (2007). The Relationship between Blood Flow and Neuronal Activity in the Rodent Olfactory Bulb. *J. Neurosci.* *27*, 6452–6460.
- Champeil-Potokar, G., Hennebelle, M., Latour, A., Vancassel, S., and Denis, I. (2016). Docosahexaenoic acid (DHA) prevents corticosterone-induced changes in astrocyte morphology and function. *J. Neurochem.* *136*, 1155–1167.
- Chao, T.I., Kasa, P., and Wolff, J.R. (1997a). Distribution of astroglia in glomeruli of the rat main olfactory bulb: Exclusion from the sensory subcompartment of neuropil. *J. Comp. Neurol.* *388*, 191–210.
- Chao, T.I., Kasa, P., and Wolff, J.R. (1997b). Distribution of astroglia in glomeruli of the rat main olfactory bulb: exclusion from the sensory subcompartment of neuropil. *J. Comp. Neurol.* *388*, 191–210.
- Chapelot, D., and Louis-Sylvestre, J. (2008). The Role of Orosensory Factors in Eating Behavior as Observed in Humans. In *Appetite and Food Intake*, R. Harris, and R. Mattes, eds. (CRC Press), pp. 133–160.
- Chapman, D.B., Theodosis, D.T., Montagnese, C., Poulain, D.A., and Morris, J.F. (1986). Osmotic stimulation causes structural plasticity of neurone-glia relationships of the oxytocin but not vasopressin secreting neurones in the hypothalamic supraoptic nucleus. *Neuroscience* *17*, 679–686.
- Chavez, M., Seeley, R.J., and Woods, S.C. (1995). A comparison between effects of intraventricular insulin and intraperitoneal lithium chloride on three measures sensitive to emetic agents. *Behav. Neurosci.* *109*, 547–550.
- Chebat, J.-C., and Michon, R. (2003). Impact of ambient odors on mall shoppers' emotions, cognition, and spending: A test of competitive causal theories. *J. Bus. Res.* *56*, 529–539.
- Chess, A., Simon, I., Cedar, H., and Axel, R. (1994). Allelic inactivation regulates olfactory receptor gene expression. *Cell* *78*, 823–834.
- Chiu, K., and Greer, C.A. (1996). Immunocytochemical analyses of astrocyte development in the olfactory bulb. *Brain Res. Dev. Brain Res.* *95*, 28–37.
- Choeiri, C., Staines, W., and Messier, C. (2002). Immunohistochemical localization and quantification of glucose transporters in the mouse brain. *Neuroscience* *111*, 19–34.
- Chowen, J.A., Argente-Arizón, P., Freire-Regatillo, A., Frago, L.M., Horvath, T.L., and Argente, J. (2016). The role of astrocytes in the hypothalamic response and adaptation to metabolic signals. *Prog. Neurobiol.* *144*, 68–87.
- Chua, S.C., Leibel, R.L., and Hirsch, J. (1991). Food deprivation and age modulate neuropeptide gene expression in the murine hypothalamus and adrenal gland. *Brain Res. Mol. Brain Res.* *9*, 95–101.
- Collot, M., Wilms, C.D., Bentkhayet, A., Marcaggi, P., Couchman, K., Charpak, S., Dieudonné, S., Häusser, M., Feltz, A., and Mallet, J.-M. (2015). CaRuby-Nano: a novel high affinity calcium probe for dual color imaging. *eLife* *4*.

Cornell-Bell, A.H., Finkbeiner, S.M., Cooper, M.S., and Smith, S.J. (1990). Glutamate induces calcium waves in cultured astrocytes: long-range glial signaling. *Science* 247, 470–473.

Cota, D. (2006). Hypothalamic mTOR Signaling Regulates Food Intake. *Science* 312, 927–930.

Cowley, M.A., Smart, J.L., Rubinstein, M., Cerdán, M.G., Diano, S., Horvath, T.L., Cone, R.D., and Low, M.J. (2001). Leptin activates anorexigenic POMC neurons through a neural network in the arcuate nucleus. *Nature* 411, 480–484.

Cox, H.M., Tough, I.R., Woolston, A.-M., Zhang, L., Nguyen, A.D., Sainsbury, A., and Herzog, H. (2010). Peptide YY Is Critical for Acylethanolamine Receptor Gpr119-Induced Activation of Gastrointestinal Mucosal Responses. *Cell Metab.* 11, 532–542.

Crompton, E., Wine, D.B., and Drenick, E.J. (1967). EFFECT OF PROLONGED FASTING ON OLFACTORY THRESHOLD. *Psychol. Rep.* 21, 692–692.

Cummings, D.E. (2006). Ghrelin and the short- and long-term regulation of appetite and body weight. *Physiol. Behav.* 89, 71–84.

Cummings, D.E., Purnell, J.Q., Frayo, R.S., Schmidova, K., Wisse, B.E., and Weigle, D.S. (2001). A preprandial rise in plasma ghrelin levels suggests a role in meal initiation in humans. *Diabetes* 50, 1714–1719.

Currie, P.J., and Coscina, D.V. (1995). Dissociated feeding and hypothermic effects of neuropeptide Y in the paraventricular and perifornical hypothalamus. *Peptides* 16, 599–604.

D

Danbolt, N.C. (2001). Glutamate uptake. *Prog. Neurobiol.* 65, 1–105.

Davies, L., and Marks, J.L. (1994). Role of hypothalamic neuropeptide Y gene expression in body weight regulation. *Am. J. Physiol.* 266, R1687-1691.

De Saint Jan, D. (2005). Detecting Activity in Olfactory Bulb Glomeruli with Astrocyte Recording. *J. Neurosci.* 25, 2917–2924.

De Vriese, C., Gregoire, F., Lema-Kisoka, R., Waelbroeck, M., Robberecht, P., and Delporte, C. (2004). Ghrelin Degradation by Serum and Tissue Homogenates: Identification of the Cleavage Sites. *Endocrinology* 145, 4997–5005.

Decressac, M., and Barker, R.A. (2012). Neuropeptide Y and its role in CNS disease and repair. *Exp. Neurol.* 238, 265–272.

Decressac, M., Prestoz, L., Veran, J., Cantereau, A., Jaber, M., and Gaillard, A. (2009). Neuropeptide Y stimulates proliferation, migration and differentiation of neural precursors from the subventricular zone in adult mice. *Neurobiol. Dis.* 34, 441–449.

Delaere, F., Akaoka, H., De Vadder, F., Duchamp, A., and Mithieux, G. (2013). Portal glucose influences the sensory, cortical and reward systems in rats. *Eur. J. Neurosci.* 38, 3476–3486.

- Derouiche, A., and Frotscher, M. (2001). Peripheral astrocyte processes: monitoring by selective immunostaining for the actin-binding ERM proteins. *Glia* 36, 330–341.
- Derouiche, A., Anlauf, E., Aumann, G., Mühlstädt, B., and Lavalie, M. (2002). Anatomical aspects of glia-synapse interaction: the perisynaptic glial sheath consists of a specialized astrocyte compartment. *J. Physiol. Paris* 96, 177–182.
- Devaraju, P., Sun, M.-Y., Myers, T.L., Lauderdale, K., and Fiacco, T.A. (2013). Astrocytic group I mGluR-dependent potentiation of astrocytic glutamate and potassium uptake. *J. Neurophysiol.* 109, 2404–2414.
- Di Marzo, V. (2008). Targeting the endocannabinoid system: to enhance or reduce? *Nat. Rev. Drug Discov.* 7, 438–455.
- Dietze, S., Lees, K., Fink, H., Brosda, J., and Voigt, J.-P. (2016a). Food Deprivation, Body Weight Loss and Anxiety-Related Behavior in Rats. *Animals* 6, 4.
- Dietze, S., Lees, K.R., Fink, H., Brosda, J., and Voigt, J.-P. (2016b). Food Deprivation, Body Weight Loss and Anxiety-Related Behavior in Rats. *Animals* 6, 4.
- DiPatrizio, N.V., and Simansky, K.J. (2008). Inhibiting parabrachial fatty acid amide hydrolase activity selectively increases the intake of palatable food via cannabinoid CB1 receptors. *AJP Regul. Integr. Comp. Physiol.* 295, R1409–R1414.
- Dixit, V.D., Weeraratna, A.T., Yang, H., Bertak, D., Cooper-Jenkins, A., Riggins, G.J., Eberhart, C.G., and Taub, D.D. (2006). Ghrelin and the Growth Hormone Secretagogue Receptor Constitute a Novel Autocrine Pathway in Astrocytoma Motility. *J. Biol. Chem.* 281, 16681–16690.
- van Dongen, M.V., van den Berg, M.C., Vink, N., Kok, F.J., and de Graaf, C. (2012). Taste–nutrient relationships in commonly consumed foods. *Br. J. Nutr.* 108, 140–147.
- Doty, R.L. (1986). Odor-guided behavior in mammals. *Experientia* 42, 257–271.
- Døving, K.B., and Trotier, D. (1998). Structure and function of the vomeronasal organ. *J. Exp. Biol.* 201, 2913–2925.
- Doyle, K.L., Karl, T., Hort, Y., Duffy, L., Shine, J., and Herzog, H. (2008). Y1 receptors are critical for the proliferation of adult mouse precursor cells in the olfactory neuroepithelium. *J. Neurochem.* 105, 641–652.
- Doyle, K.L., Hort, Y.J., Herzog, H., and Shine, J. (2012). Neuropeptide Y and peptide YY have distinct roles in adult mouse olfactory neurogenesis. *J. Neurosci. Res.* 90, 1126–1135.
- Druce, M.R., Wren, A.M., Park, A.J., Milton, J.E., Patterson, M., Frost, G., Ghatgei, M.A., Small, C., and Bloom, S.R. (2005). Ghrelin increases food intake in obese as well as lean subjects. *Int. J. Obes.* 29, 1130–1136.
- Duclaux, R., Feisthauer, J., and Cabanac, M. (1973). [Effects of a meal on the pleasantness of food and nonfood odors in man]. *Physiol. Behav.* 10, 1029–1033.
- Dumont, Y., Fournier, A., St-Pierre, S., and Quirion, R. (1996). Autoradiographic distribution of [125I]Leu31,Pro34]PYY and [125I]PYY3-36 binding sites in the rat brain evaluated with two newly developed Y1 and Y2 receptor radioligands. *Synapse* 22, 139–158.

E

Ebihara, T., Ebihara, S., Maruyama, M., Kobayashi, M., Itou, A., Arai, H., and Sasaki, H. (2006). A Randomized Trial of Olfactory Stimulation Using Black Pepper Oil in Older People with Swallowing Dysfunction: OLFATORY STIMULATION IN OLDER PEOPLE WITH SWALLOWING DYSFUNCTION. *J. Am. Geriatr. Soc.* *54*, 1401–1406.

Egecioglu, E., Jerlhag, E., Salomé, N., Skibicka, K.P., Haage, D., Bohlooly-Y, M., Andersson, D., Bjursell, M., Perrissoud, D., Engel, J.A., et al. (2010). Ghrelin increases intake of rewarding food in rodents: Ghrelin and food reward. *Addict. Biol.* *15*, 304–311.

El Messari, S., Leloup, C., Quignon, M., Brisorgueil, M.J., Penicaud, L., and Arluison, M. (1998). Immunocytochemical localization of the insulin-responsive glucose transporter 4 (Glut4) in the rat central nervous system. *J. Comp. Neurol.* *399*, 492–512.

Elias, C.F., Lee, C., Kelly, J., Aschkenasi, C., Ahima, R.S., Couceyro, P.R., Kuhar, M.J., Saper, C.B., and Elmquist, J.K. (1998). Leptin activates hypothalamic CART neurons projecting to the spinal cord. *Neuron* *21*, 1375–1385.

Engelen, L., de Wijk, R.A., Prinz, J.F., van der Bilt, A., and Bosman, F. (2003). The relation between saliva flow after different stimulations and the perception of flavor and texture attributes in custard desserts. *Physiol. Behav.* *78*, 165–169.

Epstein, L.H., Saad, F.G., Handley, E.A., Roemmich, J.N., Hawk, L.W., and McSweeney, F.K. (2003). Habituation of salivation and motivated responding for food in children. *Appetite* *41*, 283–289.

Escartin, C., and Rouach, N. (2013). Astroglial networking contributes to neurometabolic coupling. *Front. Neuroenergetics* *5*.

Esch, T., and Stefano, G.B. (2005). The Neurobiology of Love. *Neuro Endocrinol. Lett.* *26*, 175–192.

F

Fadool, D.A., and Levitan, I.B. (1998). Modulation of olfactory bulb neuron potassium current by tyrosine phosphorylation. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *18*, 6126–6137.

Fadool, D.A., Tucker, K., Phillips, J.J., and Simmen, J.A. (2000). Brain insulin receptor causes activity-dependent current suppression in the olfactory bulb through multiple phosphorylation of Kv1.3. *J. Neurophysiol.* *83*, 2332–2348.

Fadool, D.A., Tucker, K., and Pedarzani, P. (2011). 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.

Fantino, M. (1984). Role of sensory input in the control of food intake. *J. Auton. Nerv. Syst.* *10*, 347–358.

- Farrant, M., and Nusser, Z. (2005). Variations on an inhibitory theme: phasic and tonic activation of GABAA receptors. *Nat. Rev. Neurosci.* *6*, 215–229.
- Feldman, M., and Richardson, C.T. (1986). Role of thought, sight, smell, and taste of food in the cephalic phase of gastric acid secretion in humans. *Gastroenterology* *90*, 428–433.
- Fernández-Aranda, F., Agüera, Z., Fernández-García, J.C., Garrido-Sanchez, L., Alcaide-Torres, J., Tinahones, F.J., Giner-Bartolomé, C., Baños, R.M., Botella, C., Cebolla, A., et al. (2016). Smell–taste dysfunctions in extreme weight/eating conditions: analysis of hormonal and psychological interactions. *Endocrine* *51*, 256–267.
- Fiacco, T.A., Agulhon, C., Taves, S.R., Petravicz, J., Casper, K.B., Dong, X., Chen, J., and McCarthy, K.D. (2007). Selective Stimulation of Astrocyte Calcium In Situ Does Not Affect Neuronal Excitatory Synaptic Activity. *Neuron* *54*, 611–626.
- Figlewicz, D.P., Sipols, A.J., Seeley, R.J., Chavez, M., Woods, S.C., and Porte, D. (1995). Intraventricular insulin enhances the meal-suppressive efficacy of intraventricular cholecystokinin octapeptide in the baboon. *Behav. Neurosci.* *109*, 567–569.
- Filosa, A., Paixão, S., Honsek, S.D., Carmona, M.A., Becker, L., Feddersen, B., Gaitanos, L., Rudhard, Y., Schoepfer, R., Klopstock, T., et al. (2009). Neuron-glia communication via EphA4/ephrin-A3 modulates LTP through glial glutamate transport. *Nat. Neurosci.* *12*, 1285–1292.
- Flanagan, D.E., Evans, M.L., Monsod, T.P., Rife, F., Heptulla, R.A., Tamborlane, W.V., and Sherwin, R.S. (2003). The influence of insulin on circulating ghrelin: Fig. 1. *Am. J. Physiol. - Endocrinol. Metab.* *284*, E313–E316.
- Fletcher ML, Chen WR (2010). Neural correlates of olfactory learning: Critical role of centrifugal neuromodulation. *Learn Mem.* *17*(11): 561–570.
- Freiherr, J., Hallschmid, M., Frey, W.H., Brünner, Y.F., Chapman, C.D., Hölscher, C., Craft, S., De Felice, F.G., and Benedict, C. (2013). Intranasal Insulin as a Treatment for Alzheimer’s Disease: A Review of Basic Research and Clinical Evidence. *CNS Drugs* *27*, 505–514.
- Friedman, J.M., and Halaas, J.L. (1998). Leptin and the regulation of body weight in mammals. *Nature* *395*, 763–770.
- Friedrich, R.W., and Korsching, S.I. (1998). Chemotopic, Combinatorial, and Noncombinatorial Odorant Representations in the Olfactory Bulb Revealed Using a Voltage-Sensitive Axon Tracer. *J. Neurosci.* *18*, 9977–9988.
- Fuente-Martín, E., García-Cáceres, C., Granado, M., de Ceballos, M.L., Sánchez-Garrido, M.Á., Sarman, B., Liu, Z.-W., Dietrich, M.O., Tena-Sempere, M., Argente-Arizón, P., et al. (2012). Leptin regulates glutamate and glucose transporters in hypothalamic astrocytes. *J. Clin. Invest.* *122*, 3900–3913.
- Fuente-Martín, E., García-Cáceres, C., Argente-Arizón, P., Díaz, F., Granado, M., Freire-Regatillo, A., Castro-González, D., Ceballos, M.L., Frago, L.M., Dickson, S.L., et al. (2016). Ghrelin Regulates Glucose and Glutamate Transporters in Hypothalamic Astrocytes. *Sci. Rep.* *6*, 23673.
- Furchtgott, E., and Friedman, M.P. (1960). The effects of hunger on taste and odor RLs. *J. Comp. Physiol. Psychol.* *53*, 576–581.

G

Gallo, V., and Deneen, B. (2014). Glial Development: The Crossroads of Regeneration and Repair in the CNS. *Neuron* 83, 283–308.

García-Cáceres, C., Fuente-Martín, E., Burgos-Ramos, E., Granado, M., Frago, L.M., Barrios, V., Horvath, T., Argente, J., and Chowen, J.A. (2011). Differential Acute and Chronic Effects of Leptin on Hypothalamic Astrocyte Morphology and Synaptic Protein Levels. *Endocrinology* 152, 1809–1818.

García-Cáceres, C., Fuente-Martín, E., Díaz, F., Granado, M., Argente-Arizón, P., Frago, L.M., Freire-Regatillo, A., Barrios, V., Argente, J., and Chowen, J.A. (2014). The Opposing Effects of Ghrelin on Hypothalamic and Systemic Inflammatory Processes Are Modulated by Its Acylation Status and Food Intake in Male Rats. *Endocrinology* 155, 2868–2880.

García-Cáceres, C., Quarta, C., Varela, L., Gao, Y., Gruber, T., Legutko, B., Jastroch, M., Johansson, P., Ninkovic, J., Yi, C.-X., et al. (2016). Astrocytic Insulin Signaling Couples Brain Glucose Uptake with Nutrient Availability. *Cell* 166, 867–880.

García-Segura, L.M. (2008). Aromatase in the Brain: Not Just for Reproduction Anymore. *J. Neuroendocrinol.* 20, 705–712.

Gascuel, J., Lemoine, A., Rigault, C., Datiche, F., Benani, A., Penicaud, L., and Lopez-Mascaraque, L. (2012). Hypothalamus-Olfactory System Crosstalk: Orexin A Immunostaining in Mice. *Front. Neuroanat.* 6.

Geloso, M.C., Corvino, V., Di Maria, V., Marchese, E., and Michetti, F. (2015). Cellular targets for neuropeptide Y-mediated control of adult neurogenesis. *Front. Cell. Neurosci.* 9.

Gengatharan, A., Bammann, R.R., and Saghatelian, A. (2016). The Role of Astrocytes in the Generation, Migration, and Integration of New Neurons in the Adult Olfactory Bulb. *Front. Neurosci.* 10.

Genoud, C., Quairiaux, C., Steiner, P., Hirling, H., Welker, E., and Knott, G.W. (2006). Plasticity of Astrocytic Coverage and Glutamate Transporter Expression in Adult Mouse Cortex. *PLoS Biol.* 4, e343.

Gerhold, L.M., and Wise, P.M. (2006). Vasoactive Intestinal Polypeptide Regulates Dynamic Changes in Astrocyte Morphometry: Impact on Gonadotropin-Releasing Hormone Neurons. *Endocrinology* 147, 2197–2202.

Getchell, T.V., Kwong, K., Saunders, C.P., Stromberg, A.J., and Getchell, M.L. (2006). Leptin regulates olfactory-mediated behavior in ob/ob mice. *Physiol. Behav.* 87, 848–856.

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

Giaume, C. (2010). Astroglial Wiring is Adding Complexity to Neuroglial Networking. *Front. Neuroenergetics* 2.

Giaume, C., and McCarthy, K.D. (1996). Control of gap-junctional communication in astrocytic networks. *Trends Neurosci.* 19, 319–325.

- Girardet, C., Becquet, D., Blanchard, M.-P., François-Bellan, A.-M., and Bosler, O. (2010). Neuroglial and synaptic rearrangements associated with photic entrainment of the circadian clock in the suprachiasmatic nucleus: Daily structural plasticity of the circadian clock. *Eur. J. Neurosci.* *32*, 2133–2142.
- Glaze, J.A. (1928). Sensitivity to Odors and Other Phenomena during a Fast. *Am. J. Psychol.* *40*, 569.
- Goetzl, F.R., and Stone, F. (1947). Diurnal variations in acuity of olfaction and food intake. *Gastroenterology* *9*, 444–453.
- Goetzl, F.R., Abel, M.S., and Ahokas, A.J. (1950). Occurrence in normal individuals of diurnal variations in olfactory acuity. *J. Appl. Physiol.* *2*, 553–562.
- Gonzalez, J.A., Jensen, L.T., Fugger, L., and Burdakov, D. (2008). Metabolism-Independent Sugar Sensing in Central Orexin Neurons. *Diabetes* *57*, 2569–2576.
- Gordon, G.R.J., Baimoukhametova, D.V., Hewitt, S.A., Rajapaksha, W.R.A.K.J.S., Fisher, T.E., and Bains, J.S. (2005). Norepinephrine triggers release of glial ATP to increase postsynaptic efficacy. *Nat. Neurosci.* *8*, 1078–1086.
- Gordon M. Shepherd (2004). *The Synaptic Organization of the Brain* (Oxford University Press).
- Goriely, A.R., Secomb, T.W., and Tolbert, L.P. (2002). Effect of the Glial Envelope on Extracellular K⁺ Diffusion in Olfactory Glomeruli. *J. Neurophysiol.* *87*, 1712–1722.
- Götz, M., Sirko, S., Beckers, J., and Irmeler, M. (2015). Reactive astrocytes as neural stem or progenitor cells: In vivo lineage, In vitro potential, and Genome-wide expression analysis: Hallmarks of Neural Stem Cells *In Vivo* and *In Vitro*. *Glia* *63*, 1452–1468.
- Gouveri, E., Katotomichelakis, M., Gouveris, H., Danielides, V., Maltezos, E., and Papanas, N. (2014). Olfactory Dysfunction in Type 2 Diabetes Mellitus: An Additional Manifestation of Microvascular Disease? *Angiology* *65*, 869–876.
- Graham, M., Shutter, J.R., Sarmiento, U., Sarosi, Ildiko, and Stark, K.L. (1997). Overexpression of *Agrt* leads to obesity in transgenic mice. *Nat. Genet.* *17*, 273–274.
- Grill, H.J., Schwartz, M.W., Kaplan, J.M., Foxhall, J.S., Breininger, J., and Baskin, D.G. (2002). Evidence that the caudal brainstem is a target for the inhibitory effect of leptin on food intake. *Endocrinology* *143*, 239–246.
- Grimaldi, D., Silvani, A., Benarroch, E.E., and Cortelli, P. (2014). Orexin/hypocretin system and autonomic control: New insights and clinical correlations. *Neurology* *82*, 271–278.
- Grönholm, M., Teesalu, T., Tyynelä, J., Piltti, K., Böhling, T., Wartiovaara, K., Vaheri, A., and Carpén, O. (2005). Characterization of the NF2 protein merlin and the ERM protein ezrin in human, rat, and mouse central nervous system. *Mol. Cell. Neurosci.* *28*, 683–693.
- Gurden, H., Uchida, N., and Mainen, Z.F. (2006). Sensory-Evoked Intrinsic Optical Signals in the Olfactory Bulb Are Coupled to Glutamate Release and Uptake. *Neuron* *52*, 335–345.
- Guzmán, M., and Blázquez, C. (2001). Is there an astrocyte-neuron ketone body shuttle? *Trends Endocrinol. Metab. TEM* *12*, 169–173.

H

- Haber, M. (2006). Cooperative Astrocyte and Dendritic Spine Dynamics at Hippocampal Excitatory Synapses. *J. Neurosci.* *26*, 8881–8891.
- Hahn, T.M., Breininger, J.F., Baskin, D.G., and Schwartz, M.W. (1998). Coexpression of *Agrp* and NPY in fasting-activated hypothalamic neurons. *Nat. Neurosci.* *1*, 271–272.
- Halassa, M.M., Fellin, T., and Haydon, P.G. (2007a). The tripartite synapse: roles for gliotransmission in health and disease. *Trends Mol. Med.* *13*, 54–63.
- Halassa, M.M., Fellin, T., Takano, H., Dong, J.-H., and Haydon, P.G. (2007b). Synaptic Islands Defined by the Territory of a Single Astrocyte. *J. Neurosci.* *27*, 6473–6477.
- Hammer, F.J. (1951). The relation of odor, taste and flicker-fusion thresholds to food intake. *J. Comp. Physiol. Psychol.* *44*, 403–411.
- Hanci, D., and Altun, H. (2016). Hunger state affects both olfactory abilities and gustatory sensitivity. *Eur. Arch. Otorhinolaryngol.* *273*, 1637–1641.
- Hansel, D.E., Eipper, B.A., and Ronnett, G.V. (2001). Neuropeptide Y functions as a neuroproliferative factor. *Nature* *410*, 940–944.
- Hansson, E., Johansson, B.B., Westergren, I., and Rönnbäck, L. (1994). Glutamate-induced swelling of single astroglial cells in primary culture. *Neuroscience* *63*, 1057–1066.
- Hardy, A.B., Aïoun, J., Baly, C., Julliard, K.A., Caillol, M., Salesse, R., and Duchamp-Viret, P. (2005). Orexin A Modulates Mitral Cell Activity in the Rat Olfactory Bulb: Patch-Clamp Study on Slices and Immunocytochemical Localization of Orexin Receptors. *Endocrinology* *146*, 4042–4053.
- Harrold JA, Dovey TM, Blundell JE, Halford JC. (2012). CNS regulation of appetite. *Neuropharmacology.* *63*(1):3-17
- Harrold, J.A., Widdowson, P.S., and Williams, G. (1999). Altered energy balance causes selective changes in melanocortin-4(MC4-R), but not melanocortin-3 (MC3-R), receptors in specific hypothalamic regions: further evidence that activation of MC4-R is a physiological inhibitor of feeding. *Diabetes* *48*, 267–271.
- Harrold, J.A., Dovey, T.M., Blundell, J.E., and Halford, J.C.G. (2012). CNS regulation of appetite. *Neuropharmacology* *63*, 3–17.
- Hatton, G.I., Perlmutter, L.S., Salm, A.K., and Tweedle, C.D. (1984). Dynamic neuronal-glia interactions in hypothalamus and pituitary: implications for control of hormone synthesis and release. *Peptides* *5 Suppl 1*, 121–138.
- Hayar, A. (2004). External Tufted Cells: A Major Excitatory Element That Coordinates Glomerular Activity. *J. Neurosci.* *24*, 6676–6685.
- Haydon, P.G. (2006). Astrocyte Control of Synaptic Transmission and Neurovascular Coupling. *Physiol. Rev.* *86*, 1009–1031.

Haynes, A.C., Jackson, B., Chapman, H., Tadayyon, M., Johns, A., Porter, R.A., and Arch, J.R. (2000). A selective orexin-1 receptor antagonist reduces food consumption in male and female rats. *Regul. Pept.* *96*, 45–51.

Heller, J.P., and Rusakov, D.A. (2015). Morphological plasticity of astroglia: Understanding synaptic microenvironment: Morphological Plasticity of Astroglia. *Glia* *63*, 2133–2151.

Herman, C., and Polivy, J. (2005). Normative influences on food intake. *Physiol. Behav.* *86*, 762–772.

Hetherington, M.M., and Boyland, E. (2007). Short-term effects of chewing gum on snack intake and appetite. *Appetite* *48*, 397–401.

Higgs, S., Williams, C.M., and Kirkham, T.C. (2003). Cannabinoid influences on palatability: microstructural analysis of sucrose drinking after Δ^9 -tetrahydrocannabinol, anandamide, 2-arachidonoyl glycerol and SR141716. *Psychopharmacology (Berl.)* *165*, 370–377.

Hill, J.M., Lesniak, M.A., Pert, C.B., and Roth, J. (1986). Autoradiographic localization of insulin receptors in rat brain: prominence in olfactory and limbic areas. *Neuroscience* *17*, 1127–1138.

Hirrlinger, J., Hülsmann, S., and Kirchhoff, F. (2004). Astroglial processes show spontaneous motility at active synaptic terminals in situ. *Eur. J. Neurosci.* *20*, 2235–2239.

Hirsch, D., and Zukowska, Z. (2012). NPY and Stress 30 Years Later: The Peripheral View. *Cell. Mol. Neurobiol.* *32*, 645–659.

Horvath, T.L. (2006). Synaptic Plasticity in Energy Balance Regulation. *Obesity* *14*, 228S–233S.

Horvath, T.L., Diano, S., Sotonyi, P., Heiman, M., and Tschöp, M. (2001). Minireview: Ghrelin and the Regulation of Energy Balance—A Hypothalamic Perspective. *Endocrinology* *142*, 4163–4169.

Horvath, T.L., Sarman, B., Garcia-Caceres, C., Enriori, P.J., Sotonyi, P., Shanabrough, M., Borok, E., Argente, J., Chowen, J.A., Perez-Tilve, D., et al. (2010). Synaptic input organization of the melanocortin system predicts diet-induced hypothalamic reactive gliosis and obesity. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *107*, 14875–14880.

Hösli, L., Hösli, E., and Käser, H. (1993). Colocalization of cholinergic, adrenergic and peptidergic receptors on astrocytes. *Neuroreport* *4*, 679–682.

Howarth, C. (2014). The contribution of astrocytes to the regulation of cerebral blood flow. *Front. Neurosci.* *8*.

Hsuchou, H., He, Y., Kastin, A.J., Tu, H., Markadakis, E.N., Rogers, R.C., Fossier, P.B., and Pan, W. (2008). Obesity induces functional astrocytic leptin receptors in hypothalamus. *Brain* *132*, 889–902.

Hutch, C.R., Hillard, C.J., Jia, C., and Hegg, C.C. (2015). An endocannabinoid system is present in the mouse olfactory epithelium but does not modulate olfaction. *Neuroscience* *300*, 539–553.

I

Ibarra-Soria, X., Levitin, M.O., Saraiva, L.R., and Logan, D.W. (2014). The Olfactory Transcriptomes of Mice. *PLoS Genet.* *10*, e1004593.

Ibrahim, N., Bosch, M.A., Smart, J.L., Qiu, J., Rubinstein, M., Rønnekleiv, O.K., Low, M.J., and Kelly, M.J. (2003). Hypothalamic proopiomelanocortin neurons are glucose responsive and express K(ATP) channels. *Endocrinology* 144, 1331–1340.

Iino, M. (2001). Glia-Synapse Interaction Through Ca²⁺-Permeable AMPA Receptors in Bergmann Glia. *Science* 292, 926–929.

Islam, M.A., Fagundo, A.B., Arcelus, J., Agüera, Z., Jiménez-Murcia, S., Fernández-Real, J.M., Tinahones, F.J., de la Torre, R., Botella, C., Frühbeck, G., et al. (2015). Olfaction in eating disorders and abnormal eating behavior: a systematic review. *Front. Psychol.* 6.

J

Jahr, C.E., and Nicoll, R.A. (1981). Primary afferent depolarization in the in vitro frog olfactory bulb. *J. Physiol.* 318, 375–384.

Janowitz, H.D., and Grossman, M.I. (1949). Gusto-olfactory thresholds in relation to appetite and hunger sensations. *J. Appl. Physiol.* 2, 217–222.

Jansen, A., Theunissen, N., Slechten, K., Nederkoorn, C., Boon, B., Mulken, S., and Roefs, A. (2003). Overweight children overeat after exposure to food cues. *Eat. Behav.* 4, 197–209.

Jayaram, B., Pan, W., Wang, Y., Hsueh, H., Mace, A., Cornelissen-Guillaume, G.G., Mishra, P.K., Koza, R.A., and Kastin, A.J. (2013). Astrocytic leptin-receptor knockout mice show partial rescue of leptin resistance in diet-induced obesity. *J. Appl. Physiol.* 114, 734–741.

Jia, C., and Hegg, C.C. (2010). NPY mediates ATP-induced neuroproliferation in adult mouse olfactory epithelium. *Neurobiol. Dis.* 38, 405–413.

Jiang, T., Soussignan, R., Rigaud, D., Martin, S., Royet, J.-P., Brondel, L., and Schaal, B. (2008). Alliesthesia to food cues: Heterogeneity across stimuli and sensory modalities. *Physiol. Behav.* 95, 464–470.

Johnson, B.A., and Leon, M. (2000). Modular representations of odorants in the glomerular layer of the rat olfactory bulb and the effects of stimulus concentration. *J. Comp. Neurol.* 422, 496–509.

Johnson, W.G., and Wildman, H.E. (1983). Influence of external and covert food stimuli on insulin secretion in obese and normal persons. *Behav. Neurosci.* 97, 1025–1028.

Jones, T.A., Hawrylak, N., and Greenough, W.T. (1996). Rapid laminar-dependent changes in GFAP immunoreactive astrocytes in the visual cortex of rats reared in a complex environment. *Psychoneuroendocrinology* 21, 189–201.

Julliard, A., Chaput, M., Apfelbaum, A., Aime, P., Mahfouz, M., and Duchampviret, P. (2007a). Changes in rat olfactory detection performance induced by orexin and leptin mimicking fasting and satiation. *Behav. Brain Res.* 183, 123–129.

Julliard, A., Chaput, M., Apfelbaum, A., Aime, P., Mahfouz, M., and Duchampviret, P. (2007b). Changes in rat olfactory detection performance induced by orexin and leptin mimicking fasting and satiation. *Behav. Brain Res.* 183, 123–129.

K

- Kacem, K., Lacombe, P., Seylaz, J., and Bonvento, G. (1998). Structural organization of the perivascular astrocyte endfeet and their relationship with the endothelial glucose transporter: a confocal microscopy study. *Glia* 23, 1–10.
- Kang, J., Jiang, L., Goldman, S.A., and Nedergaard, M. (1998). Astrocyte-mediated potentiation of inhibitory synaptic transmission. *Nat. Neurosci.* 1, 683–692.
- Karatsoreos, I.N., Thaler, J.P., Borgland, S.L., Champagne, F.A., Hurd, Y.L., and Hill, M.N. (2013). Food for Thought: Hormonal, Experiential, and Neural Influences on Feeding and Obesity. *J. Neurosci.* 33, 17610–17616.
- Kasowski, H.J., Kim, H., and Greer, C.A. (1999a). Compartmental organization of the olfactory bulb glomerulus. *J. Comp. Neurol.* 407, 261–274.
- Kasowski, H.J., Kim, H., and Greer, C.A. (1999b). Compartmental organization of the olfactory bulb glomerulus. *J. Comp. Neurol.* 407, 261–274.
- Kersanté, F., Rowley, S.C.S., Pavlov, I., Gutiérrez-Mecinas, M., Semyanov, A., Reul, J.M.H.M., Walker, M.C., and Linthorst, A.C.E. (2013). A functional role for both γ -aminobutyric acid (GABA) transporter-1 and GABA transporter-3 in the modulation of extracellular GABA and GABAergic tonic conductances in the rat hippocampus: Functional role of GAT-1 and GAT-3 in the regulation of GABA. *J. Physiol.* 591, 2429–2441.
- Kettenmann, H., Hanisch, U.-K., Noda, M., and Verkhratsky, A. (2011). Physiology of Microglia. *Physiol. Rev.* 91, 461–553.
- Ketterer, C., Heni, M., Thamer, C., Herzberg-Schäfer, S.A., Häring, H.-U., and Fritsche, A. (2011). Acute, short-term hyperinsulinemia increases olfactory threshold in healthy subjects. *Int. J. Obes.* 35, 1135–1138.
- Khayari, A., Math, F., and Davrainville, J.L. (1988). Electrical stimulation of primary olfactory nerve induces two types of variations in the extracellular potassium activity within the glomerulus of the rat olfactory bulb in vivo. *Brain Res.* 457, 188–191.
- Kim, J.G., Suyama, S., Koch, M., Jin, S., Argente-Arizon, P., Argente, J., Liu, Z.-W., Zimmer, M.R., Jeong, J.K., Szigeti-Buck, K., et al. (2014). Leptin signaling in astrocytes regulates hypothalamic neuronal circuits and feeding. *Nat. Neurosci.* 17, 908–910.
- Kirischuk, S., Parpura, V., and Verkhratsky, A. (2012). Sodium dynamics: another key to astroglial excitability? *Trends Neurosci.* 35, 497–506.
- Kittel, G., and Reitberger, U. (1970). [Changing effects of olfactory nerve threshold and food intake]. *Arch. Klin. Exp. Ohren. Nasen. Kehlkopfheilkd.* 196, 381–384.
- Kmiec, Z., Pokrywka, L., Kotlarz, G., and Mysliwski, A. (2006). The effects of fasting and refeeding on adrenal cortex morphometry and serum concentrations of ACTH and corticosterone in young and old male rats. *J. Physiol. Pharmacol. Off. J. Pol. Physiol. Soc.* 57 Suppl 6, 77–84.

Koehler, R.C., Roman, R.J., and Harder, D.R. (2009). Astrocytes and the regulation of cerebral blood flow. *Trends Neurosci.* 32, 160–169.

Koelega, H.S. (1994). DIURNAL VARIATIONS IN OLFACTORY SENSITIVITY AND THE RELATIONSHIP TO FOOD INTAKE. *Percept. Mot. Skills* 78, 215–226.

Kofuji, P., and Newman, E.A. (2004). Potassium buffering in the central nervous system. *Neuroscience* 129, 1043–1054.

Kojima M1, Hosoda H, Date Y, Nakazato M, Matsuo H, Kangawa K. (1999). Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature* 402(6762):656-60.

Komano-Inoue, S., Manabe, H., Ota, M., Kusumoto-Yoshida, I., Yokoyama, T.K., Mori, K., and Yamaguchi, M. (2014). Top-down inputs from the olfactory cortex in the postprandial period promote elimination of granule cells in the olfactory bulb. *Eur. J. Neurosci.* 40, 2724–2733.

Koster E.P. (2006). Diversity in the determinants of food choice: A psychological perspective, 2nd European Conference on Sensory Consumer Science of Food and Beverages, The Hague, NETHERLANDS, Sep 26-29

Kozlov, A.S., Angulo, M.C., Audinat, E., and Charpak, S. (2006). Target cell-specific modulation of neuronal activity by astrocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 103, 10058–10063.

Kreisman, N.R., and Smith, M.L. (1993). Potassium-induced changes in excitability in the hippocampal CA1 region of immature and adult rats. *Brain Res. Dev. Brain Res.* 76, 67–73.

Kristensen, P., Judge, M.E., Thim, L., Ribel, U., Christjansen, K.N., Wulff, B.S., Clausen, J.T., Jensen, P.B., Madsen, O.D., Vrang, N., et al. (1998). Hypothalamic CART is a new anorectic peptide regulated by leptin. *Nature* 393, 72–76.

Kuczewski, N., Fourcaud-Trocmé, N., Savigner, A., Thevenet, M., Aimé, P., Garcia, S., Duchamp-Viret, P., and Palouzier-Paulignan, B. (2014). Insulin modulates network activity in olfactory bulb slices: impact on odour processing: Insulin modulation in the OB: impact on odour processing. *J. Physiol.* 592, 2751–2769.

L

Lacroix, M.-C., Badonnel, K., Meunier, N., Tan, F., Poupon, C.S.-L., Durieux, D., Monnerie, R., Baly, C., Congar, P., Salesse, R., et al. (2008). Expression of Insulin System in the Olfactory Epithelium: First Approaches to its Role and Regulation. *J. Neuroendocrinol.* 20, 1176–1190.

Lacroix, M.-C., Caillol, M., Durieux, D., Monnerie, R., Grebert, D., Pellerin, L., Repond, C., Tolle, V., Zizzari, P., and Baly, C. (2015). Long-Lasting Metabolic Imbalance Related to Obesity Alters Olfactory Tissue Homeostasis and Impairs Olfactory-Driven Behaviors. *Chem. Senses* 40, 537–556.

Lacroix MC, et al. (2016); Flavor: From food to behaviors, wellbeing and health. Elsevier

Lalo, U., Palygin, O., Rasooli-Nejad, S., Andrew, J., Haydon, P.G., and Pankratov, Y. (2014). Exocytosis of ATP From Astrocytes Modulates Phasic and Tonic Inhibition in the Neocortex. *PLoS Biol.* 12, e1001747.

- Lambert, K.G., Gerecke, K.M., Quadros, P.S., Doudera, E., Jasnow, A.M., and Kinsley, C.H. (2000). Activity-stress increases density of GFAP-immunoreactive astrocytes in the rat hippocampus. *Stress Amst. Neth.* 3, 275–284.
- Lambert, P.D., Couceyro, P.R., McGirr, K.M., Dall Vechia, S.E., Smith, Y., and Kuhar, M.J. (1998). CART peptides in the central control of feeding and interactions with neuropeptide Y. *Synapse* 29, 293–298.
- Landgraf, R., and Neumann, I.D. (2004). Vasopressin and oxytocin release within the brain: a dynamic concept of multiple and variable modes of neuropeptide communication. *Front. Neuroendocrinol.* 25, 150–176.
- Langle, S.L., Poulain, D.A., and Theodosis, D.T. (2003). Induction of rapid, activity-dependent neuronal-glia remodeling in the adult rat hypothalamus in vitro. *Eur. J. Neurosci.* 18, 206–214.
- Larhammar, D. (1996). Evolution of neuropeptide Y, peptide YY and pancreatic polypeptide. *Regul. Pept.* 62, 1–11.
- Larhammar, D., Ericsson, A., and Persson, H. (1987). Structure and expression of the rat neuropeptide Y gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 84, 2068–2072.
- Larue, C., and Le Magnen, J. (1967). [Alimentary responses of the anosmic rat]. *C. R. Seances Soc. Biol. Fil.* 161, 572–576.
- Larue C, Le Magnen J (1968). Increase in hyperphagia and in obesity induced in rats by medioventral lesion of the hypothalamus under the effects of an ablation of the olfactory bulbs. *C R Acad Sci Hebd Seances Acad Sci D* 267:2348-2351.
- Larue, C., and Le Magnen, J. (1970). Effect of the removal of olfactory bulbs upon hyperphagia and obesity induced in rats by V.M.H. lesion. *Physiol. Behav.* 5, 509–513.
- Larue, C.G., and Le Magnen, J. (1972). The olfactory control of meal pattern in rats. *Physiol. Behav.* 9, 817–821.
- Lavialle, M., and Servière, J. (1995). Developmental study in the circadian clock of the golden hamster: a putative role of astrocytes. *Brain Res. Dev. Brain Res.* 86, 275–282.
- Lavialle, M., Begue, A., Papillon, C., and Vilaplana, J. (2001). Modifications of retinal afferent activity induce changes in astroglial plasticity in the hamster circadian clock. *Glia* 34, 88–100.
- Lavialle, M., Aumann, G., Anlauf, E., Prols, F., Arpin, M., and Derouiche, A. (2011). Structural plasticity of perisynaptic astrocyte processes involves ezrin and metabotropic glutamate receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 108, 12915–12919.
- Le Magnen, J. (1969). Peripheral and systemic actions of food in the caloric regulation of intake. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 157, 1126–1157.
- Le Magnen J (1984) Bases neurobiologiques du comportement alimentaire. In: *Neurobiologie des Comportements Alimen*
- Le Magnen J (1987) Central processing of sensory information in the control of feeding. *Prog Sensory Physiol* 8, 96-127

- Le Magnen, J. (1999). Increased Food Intake Induced in Rats by Changes in the Satiating Sensory Input from Food (first published in French in 1956). *Appetite* 33, 33–35.
- Le Meur, K., Mendizabal-Zubiaga, J., Grandes, P., and Audinat, E. (2012). GABA release by hippocampal astrocytes. *Front. Comput. Neurosci.* 6.
- Lee, V.M., and Linden, R.W. (1992). An olfactory-submandibular salivary reflex in humans. *Exp. Physiol.* 77, 221–224.
- Leloup, C., Arluison, M., Kassis, N., Lepetit, N., Cartier, N., Ferré, P., and Pénicaud, L. (1996). Discrete brain areas express the insulin-responsive glucose transporter GLUT4. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 38, 45–53.
- Leloup, C., Allard, C., Carneiro, L., Fioramonti, X., Collins, S., and Pénicaud, L. (2016). Glucose and hypothalamic astrocytes: More than a fueling role? *Neuroscience* 323, 110–120.
- Leventopoulos, M., Rüedi-Bettschen, D., Knuesel, I., Feldon, J., Pryce, C.R., and Opacka-Juffry, J. (2007). Long-term effects of early life deprivation on brain glia in Fischer rats. *Brain Res.* 1142, 119–126.
- Levine, A.S., and Morley, J.E. (1984). Neuropeptide Y: a potent inducer of consummatory behavior in rats. *Peptides* 5, 1025–1029.
- Li, C.H., and Lee, C.K. (1993). Minimum cross entropy thresholding. *Pattern Recognit.* 26, 617–625.
- Lin, S., Boey, D., and Herzog, H. (2004). NPY and Y receptors: lessons from transgenic and knockout models. *Neuropeptides* 38, 189–200.
- Liu, S., Aungst, J.L., Puche, A.C., and Shipley, M.T. (2012). Serotonin modulates the population activity profile of olfactory bulb external tufted cells. *J. Neurophysiol.* 107, 473–483.
- Loch, D., Breer, H., and Strotmann, J. (2015). Endocrine Modulation of Olfactory Responsiveness: Effects of the Orexigenic Hormone Ghrelin. *Chem. Senses* 40, 469–479.
- Losi, G., Mariotti, L., and Carmignoto, G. (2014). GABAergic interneuron to astrocyte signalling: a neglected form of cell communication in the brain. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 369, 20130609–20130609.
- Lucero, M.T. (2013). Peripheral modulation of smell: Fact or fiction? *Semin. Cell Dev. Biol.* 24, 58–70.
- Lundgaard, I., Li, B., Xie, L., Kang, H., Sanggaard, S., Haswell, J.D.R., Sun, W., Goldman, S., Blekot, S., Nielsen, M., et al. (2015). Direct neuronal glucose uptake heralds activity-dependent increases in cerebral metabolism. *Nat. Commun.* 6, 6807.
- Luskin, M.B., and Price, J.L. (1983). The topographic organization of associational fibers of the olfactory system in the rat, including centrifugal fibers to the olfactory bulb. *J. Comp. Neurol.* 216, 264–291.
- Lutter, M., and Nestler, E.J. (2009). Homeostatic and Hedonic Signals Interact in the Regulation of Food Intake. *J. Nutr.* 139, 629–632.

M

- Ma, X., Zubcevic, L., Bruning, J.C., Ashcroft, F.M., and Burdakov, D. (2007). Electrical Inhibition of Identified Anorexigenic POMC Neurons by Orexin/Hypocretin. *J. Neurosci.* *27*, 1529–1533.
- Magistretti, P.J. (2006). Neuron-glia metabolic coupling and plasticity. *J. Exp. Biol.* *209*, 2304–2311.
- Malnic, B., Hirono, J., Sato, T., and Buck, L.B. (1999). Combinatorial receptor codes for odors. *Cell* *96*, 713–723.
- Manzini, I., and Schild, D. (2003). Multidrug resistance transporters in the olfactory receptor neurons of *Xenopus laevis* tadpoles. *J. Physiol.* *546*, 375–385.
- Markopoulos, F., Rokni, D., Gire, D.H., and Murthy, V.N. (2012). Functional Properties of Cortical Feedback Projections to the Olfactory Bulb. *Neuron* *76*, 1175–1188.
- Marks, D.R., and Fadool, D.A. (2007). Post-synaptic density perturbs insulin-induced Kv1.3 channel modulation via a clustering mechanism involving the SH₃ domain. *J. Neurochem.* *103*, 1608–1627.
- Marks, D.R., Tucker, K., Cavallin, M.A., Mast, T.G., and Fadool, D.A. (2009). Awake Intranasal Insulin Delivery Modifies Protein Complexes and Alters Memory, Anxiety, and Olfactory Behaviors. *J. Neurosci.* *29*, 6734–6751.
- Marks, J.L., Porte, D., Stahl, W.L., and Baskin, D.G. (1990). Localization of insulin receptor mRNA in rat brain by in situ hybridization. *Endocrinology* *127*, 3234–3236.
- Martin, C., Houitte, D., Guillermier, M., Petit, F., Bonvento, G., and Gurden, H. (2012). Alteration of sensory-evoked metabolic and oscillatory activities in the olfactory bulb of GLAST-deficient mice. *Front. Neural Circuits* *6*.
- Marty, N. (2005a). Regulation of glucagon secretion by glucose transporter type 2 (glut2) and astrocyte-dependent glucose sensors. *J. Clin. Invest.* *115*, 3545–3553.
- Marty, N. (2005b). Regulation of glucagon secretion by glucose transporter type 2 (glut2) and astrocyte-dependent glucose sensors. *J. Clin. Invest.* *115*, 3545–3553.
- Massolt, E.T., van Haard, P.M., Rehfeld, J.F., Posthuma, E.F., van der Veer, E., and Schweitzer, D.H. (2010). Appetite suppression through smelling of dark chocolate correlates with changes in ghrelin in young women. *Regul. Pept.* *161*, 81–86.
- Masuzaki, H., Ogawa, Y., Sagawa, N., Hosoda, K., Matsumoto, T., Mise, H., Nishimura, H., Yoshimasa, Y., Tanaka, I., Mori, T., et al. (1997). Nonadipose tissue production of leptin: leptin as a novel placenta-derived hormone in humans. *Nat. Med.* *3*, 1029–1033.
- Matsumoto, H., and Rhoads, D.E. (1990). Specific binding of insulin to membranes from dendrodendritic synaptosomes of rat olfactory bulb. *J. Neurochem.* *54*, 347–350.
- Matsutani S., Yamamoto N. (2008). Centrifugal innervation of the mammalian olfactory bulb. *Anatomical science international.* *83*, 218-227.
- Mattes, R.D. (2006). Orosensory Considerations. *Obesity* *14*, S164–S167.

- McEwen, B.S., and Reagan, L.P. (2004). Glucose transporter expression in the central nervous system: relationship to synaptic function. *Eur. J. Pharmacol.* 490, 13–24.
- McLendon, R.E., and Bigner, D.D. (1994). Immunohistochemistry of the Glial Fibrillary Acidic Protein: Basic and Applied Considerations. *Brain Pathol.* 4, 221–228.
- Meguid, M.M., Koseki, M., Yang, Z.J., Gleason, J.R., and Laviano, A. (1997). Acute adaptive changes in food intake pattern following olfactory ablation in rats. *Neuroreport* 8, 1439–1444.
- Min, R., Santello, M., and Nevian, T. (2012). The computational power of astrocyte mediated synaptic plasticity. *Front. Comput. Neurosci.* 6.
- Molinas, A., Sicard, G., and Jakob, I. (2012). Functional Evidence of Multidrug Resistance Transporters (MDR) in Rodent Olfactory Epithelium. *PLoS ONE* 7, e36167.
- Molofsky, A.V., Krenick, R., Ullian, E., Tsai, H. -h., Deneen, B., Richardson, W.D., Barres, B.A., and Rowitch, D.H. (2012). Astrocytes and disease: a neurodevelopmental perspective. *Genes Dev.* 26, 891–907.
- Molotkov, D., Zobova, S., Arcas, J.M., and Khiroug, L. (2013). Calcium-induced outgrowth of astrocytic peripheral processes requires actin binding by Profilin-1. *Cell Calcium* 53, 338–348.
- Mongin, A.A., and Kimelberg, H.K. (2005). ATP regulates anion channel-mediated organic osmolyte release from cultured rat astrocytes via multiple Ca²⁺-sensitive mechanisms. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 288, C204–213.
- Monlezun, S., Ouali, S., Poulain, D.A., and Theodosis, D.T. (2005). Polysialic acid is required for active phases of morphological plasticity of neurosecretory axons and their glia. *Mol. Cell. Neurosci.* 29, 516–524.
- Montagnese, C., Poulain, D.A., Vincent, J.D., and Theodosis, D.T. (1988). Synaptic and neuronal-glia plasticity in the adult oxytocinergic system in response to physiological stimuli. *Brain Res. Bull.* 20, 681–692.
- Morash, B., Li, A., Murphy, P.R., Wilkinson, M., and Ur, E. (1999). Leptin Gene Expression in the Brain and Pituitary Gland. *Endocrinology* 140, 5995–5998.
- Morgello, S., Uson, R.R., Schwartz, E.J., and Haber, R.S. (1995). The human blood-brain barrier glucose transporter (GLUT1) is a glucose transporter of gray matter astrocytes. *Glia* 14, 43–54.
- Mori, K. (1987). Membrane and synaptic properties of identified neurons in the olfactory bulb. *Prog. Neurobiol.* 29, 275–320.
- Mori, K. (2006). Maps of Odorant Molecular Features in the Mammalian Olfactory Bulb. *Physiol. Rev.* 86, 409–433.
- Mori, K., and Sakano, H. (2011a). How Is the Olfactory Map Formed and Interpreted in the Mammalian Brain? *Annu. Rev. Neurosci.* 34, 467–499.
- Mori, K., and Sakano, H. (2011b). How Is the Olfactory Map Formed and Interpreted in the Mammalian Brain? *Annu. Rev. Neurosci.* 34, 467–499.

Moriizumi, T., Tsukatani, T., Sakashita, H. and Miwa, T. (1994) Olfactory disturbance induced by deafferentation of serotonergic fibers in the olfactory bulb. *Neuroscience* , 61,733 -738.

Moriya, T., Yoshinobu, Y., Kouzu, Y., Katoh, A., Gomi, H., Ikeda, M., Yoshioka, T., Itoharu, S., and Shibata, S. (2000). Involvement of glial fibrillary acidic protein (GFAP) expressed in astroglial cells in circadian rhythm under constant lighting conditions in mice. *J. Neurosci. Res.* 60, 212–218.

Morris, D.L., and Rui, L. (2009). Recent advances in understanding leptin signaling and leptin resistance. *AJP Endocrinol. Metab.* 297, E1247–E1259.

Morton, G.J., Blevins, J.E., Williams, D.L., Niswender, K.D., Gelling, R.W., Rhodes, C.J., Baskin, D.G., and Schwartz, M.W. (2005). Leptin action in the forebrain regulates the hindbrain response to satiety signals. *J. Clin. Invest.* 115, 703–710.

Morton, G.J., Cummings, D.E., Baskin, D.G., Barsh, G.S., and Schwartz, M.W. (2006). Central nervous system control of food intake and body weight. *Nature* 443, 289–295.

Mothet, J.-P., Pollegioni, L., Ouanounou, G., Martineau, M., Fossier, P., and Baux, G. (2005). Glutamate receptor activation triggers a calcium-dependent and SNARE protein-dependent release of the gliotransmitter D-serine. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 102, 5606–5611.

Mountjoy, K.G., Mortrud, M.T., Low, M.J., Simerly, R.B., and Cone, R.D. (1994). Localization of the melanocortin-4 receptor (MC4-R) in neuroendocrine and autonomic control circuits in the brain. *Mol. Endocrinol.* 8, 1298–1308.

Mulligan, C., Moreau, K., Brandolini, M., Livingstone, B., Beaufrère, B., and Boirie, Y. (2002). Alterations of sensory perceptions in healthy elderly subjects during fasting and refeeding. A pilot study. *Gerontology* 48, 39–43.

Munakata, M., Kobayashi, K., Niisato-Nezu, J., Tanaka, S., Kakisaka, Y., Ebihara, T., Ebihara, S., Haginoya, K., Tsuchiya, S., and Onuma, A. (2008). Olfactory stimulation using black pepper oil facilitates oral feeding in pediatric patients receiving long-term enteral nutrition. *Tohoku J. Exp. Med.* 214, 327–332.

Murai, K.K., Nguyen, L.N., Irie, F., Yamaguchi, Y., and Pasquale, E.B. (2003). Control of hippocampal dendritic spine morphology through ephrin-A3/EphA4 signaling. *Nat. Neurosci.* 6, 153–160.

Muroya, S., Yada, T., Shioda, S., and Takigawa, M. (1999). Glucose-sensitive neurons in the rat arcuate nucleus contain neuropeptide Y. *Neurosci. Lett.* 264, 113–116.

Muroya, S., Funahashi, H., Yamanaka, A., Kohno, D., Uramura, K., Nambu, T., Shibahara, M., Kuramochi, M., Takigawa, M., Yanagisawa, M., et al. (2004). Orexins (hypocretins) directly interact with neuropeptide Y, POMC and glucose-responsive neurons to regulate Ca²⁺ signaling in a reciprocal manner to leptin: orexigenic neuronal pathways in the mediobasal hypothalamus. *Eur. J. Neurosci.* 19, 1524–1534.

N

Nagayama, S., Homma, R., and Imamura, F. (2014). Neuronal organization of olfactory bulb circuits. *Front. Neural Circuits* 8.

- Naito, N., Kawazoe, I., Nakai, Y., and Kawauchi, H. (1988). Melanin-concentrating hormone-like immunoreactive material in the rat hypothalamus; characterization and subcellular localization. *Cell Tissue Res.* 253, 291–295.
- Naka, A., Riedl, M., Luger, A., Hummel, T., and Mueller, C.A. (2010). Clinical significance of smell and taste disorders in patients with diabetes mellitus. *Eur. Arch. Otorhinolaryngol.* 267, 547–550.
- Nakano, Y., Oomura, Y., Lénárd, L., Nishino, H., Aou, S., Yamamoto, T., and Aoyagi, K. (1986). Feeding-related activity of glucose- and morphine-sensitive neurons in the monkey amygdala. *Brain Res.* 399, 167–172.
- Nakazato, M., Murakami, N., Date, Y., Kojima, M., Matsuo, H., Kangawa, K., and Matsukura, S. (2001). [No Title]. *Nature* 409, 194–198.
- Nambu, T., Sakurai, T., Mizukami, K., Hosoya, Y., Yanagisawa, M., and Goto, K. (1999). Distribution of orexin neurons in the adult rat brain. *Brain Res.* 827, 243–260.
- Nedergaard, M., Ransom, B., and Goldman, S.A. (2003). New roles for astrocytes: Redefining the functional architecture of the brain. *Trends Neurosci.* 26, 523–530.
- Negróni, J., Meunier, N., Monnerie, R., Salesse, R., Baly, C., Caillol, M., and Congar, P. (2012). Neuropeptide Y Enhances Olfactory Mucosa Responses to Odorant in Hungry Rats. *PLoS ONE* 7, e45266.
- Nestor, M.W., Mok, L.-P., Tulapurkar, M.E., and Thompson, S.M. (2007). Plasticity of Neuron-Glial Interactions Mediated by Astrocytic EphARs. *J. Neurosci.* 27, 12817–12828.
- Neville K.R., Haberly L. Olfactory cortex. In: Shepherd G.M., editor. *The Synaptic Organization of the Brain*. 5th edition. New York: Oxford University Press; 2004. pp. 415–54.
- Nguyen, A.D., Herzog, H., and Sainsbury, A. (2011). Neuropeptide Y and peptide YY: important regulators of energy metabolism: *Curr. Opin. Endocrinol. Diabetes Obes.* 18, 56–60.
- Nichols, N.R., Osterburg, H.H., Masters, J.N., Millar, S.L., and Finch, C.E. (1990). Messenger RNA for glial fibrillary acidic protein is decreased in rat brain following acute and chronic corticosterone treatment. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 7, 1–7.
- Nimmerjahn, A., and Helmchen, F. (2012). In Vivo Labeling of Cortical Astrocytes with Sulforhodamine 101 (SR101). *Cold Spring Harb. Protoc.* 2012, pdb.prot068155-pdb.prot068155.
- Nimmerjahn, A., Kirchhoff, F., Kerr, J.N.D., and Helmchen, F. (2004). Sulforhodamine 101 as a specific marker of astroglia in the neocortex in vivo. *Nat. Methods* 1, 31–37.
- Nishida, H., and Okabe, S. (2007). Direct Astrocytic Contacts Regulate Local Maturation of Dendritic Spines. *J. Neurosci.* 27, 331–340.
- Noble, M., Wren, D., and Wolswijk, G. (1992). The O-2A(adult) progenitor cell: a glial stem cell of the adult central nervous system. *Semin. Cell Biol.* 3, 413–422.
- Nomura T, Takahashi S, Ushiki T. (2004). Cytoarchitecture of the normal rat olfactory epithelium: light and scanning electron microscopic studies. *Arch Histol Cytol.* 67(2):159-70.

Nowland, M.H., Hugunin, K.M., and Rogers, K.L. (2011). Effects of Short-Term Fasting in Male Sprague–Dawley Rats. *Comp. Med.* 61, 138–144.

Nusser, Z., and Mody, I. (2002). Selective modulation of tonic and phasic inhibitions in dentate gyrus granule cells. *J. Neurophysiol.* 87, 2624–2628.



Obara, M., Szeliga, M., and Albrecht, J. (2008). Regulation of pH in the mammalian central nervous system under normal and pathological conditions: Facts and hypotheses. *Neurochem. Int.* 52, 905–919.

Oberheim, N.A., Wang, X., Goldman, S., and Nedergaard, M. (2006). Astrocytic complexity distinguishes the human brain. *Trends Neurosci.* 29, 547–553.

Oberheim, N.A., Takano, T., Han, X., He, W., Lin, J.H.C., Wang, F., Xu, Q., Wyatt, J.D., Pilcher, W., Ojemann, J.G., et al. (2009). Uniquely Hominid Features of Adult Human Astrocytes. *J. Neurosci.* 29, 3276–3287.

Obici, S., Feng, Z., Morgan, K., Stein, D., Karkaniyas, G., and Rossetti, L. (2002). Central administration of oleic acid inhibits glucose production and food intake. *Diabetes* 51, 271–275.

O’Callaghan, J.P., Brinton, R.E., and McEwen, B.S. (1991). Glucocorticoids regulate the synthesis of glial fibrillary acidic protein in intact and adrenalectomized rats but do not affect its expression following brain injury. *J. Neurochem.* 57, 860–869.

Occhipinti, R., Somersalo, E., and Calvetti, D. (2008). Astrocytes as the Glucose Shunt for Glutamatergic Neurons at High Activity: An In Silico Study. *J. Neurophysiol.* 101, 2528–2538.

O’Connor, E.R., and Kimelberg, H.K. (1993). Role of calcium in astrocyte volume regulation and in the release of ions and amino acids. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 13, 2638–2650.

O’Doherty, J., Rolls, E.T., Francis, S., Bowtell, R., McGlone, F., Kobal, G., Renner, B., and Ahne, G. (2000). Sensory-specific satiety-related olfactory activation of the human orbitofrontal cortex. *Neuroreport* 11, 893–897.

Oliet, S.H.R. (2001). Control of Glutamate Clearance and Synaptic Efficacy by Glial Coverage of Neurons. *Science* 292, 923–926.

Oliet, S.H.R., and Bonfardin, V.D.J. (2010). Morphological plasticity of the rat supraoptic nucleus - cellular consequences: Plasticity of the rat supraoptic nucleus. *Eur. J. Neurosci.* 32, 1989–1994.

Oliet, S.H.R., Piet, R., Poulain, D.A., and Theodosis, D.T. (2004). Glial modulation of synaptic transmission: Insights from the supraoptic nucleus of the hypothalamus. *Glia* 47, 258–267.

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

Oral, E., Aydin, M.D., Aydin, N., Ozcan, H., Hacimuftuoglu, A., Sipal, S., and Demirci, E. (2013). How olfaction disorders can cause depression? The role of habenular degeneration. *Neuroscience* *240*, 63–69.

Otsu, Y., Couchman, K., Lyons, D.G., Collot, M., Agarwal, A., Mallet, J.-M., Pfrieger, F.W., Bergles, D.E., and Charpak, S. (2014). Calcium dynamics in astrocyte processes during neurovascular coupling. *Nat. Neurosci.* *18*, 210–218.

P

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

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

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

Palouzier-Paulignan, B., Lacroix, M.-C., Aime, P., Baly, C., Caillol, M., Congar, P., Julliard, A.K., Tucker, K., and Fadool, D.A. (2012a). Olfaction Under Metabolic Influences. *Chem. Senses* *37*, 769–797.

Palouzier-Paulignan, B., Lacroix, M.-C., Aime, P., Baly, C., Caillol, M., Congar, P., Julliard, A.K., Tucker, K., and Fadool, D.A. (2012b). Olfaction Under Metabolic Influences. *Chem. Senses* *37*, 769–797.

Panaro, B.L., Tough, I.R., Engelstoft, M.S., Matthews, R.T., Digby, G.J., Møller, C.L., Svendsen, B., Gribble, F., Reimann, F., Holst, J.J., et al. (2014). The Melanocortin-4 Receptor Is Expressed in Enteroendocrine L Cells and Regulates the Release of Peptide YY and Glucagon-like Peptide 1 In Vivo. *Cell Metab.* *20*, 1018–1029.

Panatier, A., Theodosis, D.T., Mothet, J.-P., Touquet, B., Pollegioni, L., Poulain, D.A., and Oliet, S.H.R. (2006). Glia-Derived d-Serine Controls NMDA Receptor Activity and Synaptic Memory. *Cell* *125*, 775–784.

Pangborn, R.M., and Berggren, B. (1973). Human Parotid Secretion in Response to Pleasant and Unpleasant Odorants. *Psychophysiology* *10*, 231–237.

Pannasch, U., Vargova, L., Reingruber, J., Ezan, P., Holcman, D., Giaume, C., Sykova, E., and Rouach, N. (2011). Astroglial networks scale synaptic activity and plasticity. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *108*, 8467–8472.

Pascual, O. (2005). Astrocytic Purinergic Signaling Coordinates Synaptic Networks. *Science* *310*, 113–116.

Patel, J.D., and Ebenezer, I.S. (2008). The effect of intraperitoneal administration of leptin on short-term food intake in rats. *Eur. J. Pharmacol.* *580*, 143–152.

Peciña, S., Smith, K.S., and Berridge, K.C. (2006). Hedonic Hot Spots in the Brain. *The Neuroscientist* *12*, 500–511.

- Pekny, M., Levéen, P., Pekna, M., Eliasson, C., Berthold, C.H., Westermark, B., and Betsholtz, C. (1995). Mice lacking glial fibrillary acidic protein display astrocytes devoid of intermediate filaments but develop and reproduce normally. *EMBO J.* *14*, 1590–1598.
- Pellerin, L., Pellegrini, G., Bittar, P.G., Charnay, Y., Bouras, C., Martin, J.L., Stella, N., and Magistretti, P.J. (1998). Evidence supporting the existence of an activity-dependent astrocyte-neuron lactate shuttle. *Dev. Neurosci.* *20*, 291–299.
- Pellerin, L., Bouzier-Sore, A.-K., Aubert, A., Serres, S., Merle, M., Costalat, R., and Magistretti, P.J. (2007). Activity-dependent regulation of energy metabolism by astrocytes: An update. *Glia* *55*, 1251–1262.
- Perea, G., and Araque, A. (2010). GLIA modulates synaptic transmission. *Brain Res. Rev.* *63*, 93–102.
- Peters, J.H., Simasko, S.M., and Ritter, R.C. (2006). Modulation of vagal afferent excitation and reduction of food intake by leptin and cholecystokinin. *Physiol. Behav.* *89*, 477–485.
- Petravicz, J., Fiacco, T.A., and McCarthy, K.D. (2008). Loss of IP3 Receptor-Dependent Ca²⁺ Increases in Hippocampal Astrocytes Does Not Affect Baseline CA1 Pyramidal Neuron Synaptic Activity. *J. Neurosci.* *28*, 4967–4973.
- Petzold, G.C., and Murthy, V.N. (2011). Role of Astrocytes in Neurovascular Coupling. *Neuron* *71*, 782–797.
- Petzold, G.C., Albeanu, D.F., Sato, T.F., and Murthy, V.N. (2008). Coupling of Neural Activity to Blood Flow in Olfactory Glomeruli Is Mediated by Astrocytic Pathways. *Neuron* *58*, 897–910.
- Peyron, C., Tighe, D.K., van den Pol, A.N., de Lecea, L., Heller, H.C., Sutcliffe, J.G., and Kilduff, T.S. (1998). Neurons containing hypocretin (orexin) project to multiple neuronal systems. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *18*, 9996–10015.
- Pinching, A.J., and Powell, T.P.S. (1971). The Neuron Types of the Glomerular Layer of the Olfactory Bulb. *J. Cell Sci.* *9*, 305–345.
- Piomelli, D. (2003). The molecular logic of endocannabinoid signalling. *Nat. Rev. Neurosci.* *4*, 873–884.
- Pírez, N., and Wachowiak, M. (2008). In vivo modulation of sensory input to the olfactory bulb by tonic and activity-dependent presynaptic inhibition of receptor neurons. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *28*, 6360–6371.
- Poggioli, R., Vergoni, A.V., and Bertolini, A. (1986). ACTH-(1-24) and alpha-MSH antagonize feeding behavior stimulated by kappa opiate agonists. *Peptides* *7*, 843–848.
- van den Pol, A.N., Finkbeiner, S.M., and Cornell-Bell, A.H. (1992). Calcium excitability and oscillations in suprachiasmatic nucleus neurons and glia in vitro. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *12*, 2648–2664.
- Porras, O.H., Ruminot, I., Loaiza, A., and Barros, L.F. (2008). Na⁺-Ca²⁺ cosignaling in the stimulation of the glucose transporter GLUT1 in cultured astrocytes. *Glia* *56*, 59–68.
- Porter, J.T., and McCarthy, K.D. (1997). Astrocytic neurotransmitter receptors in situ and in vivo. *Prog. Neurobiol.* *51*, 439–455.

Poulain, D.A., and Wakerley, J.B. (1982). Electrophysiology of hypothalamic magnocellular neurones secreting oxytocin and vasopressin. *Neuroscience* 7, 773–808.

Powell, T.P., Cowan, W.M., and Raisman, G. (1965). The central olfactory connexions. *J. Anat.* 99, 791–813.

Price, J.L., and Powell, T.P. (1970a). The mitral and short axon cells of the olfactory bulb. *J. Cell Sci.* 7, 631–651.

Price, J.L., and Powell, T.P. (1970b). The morphology of the granule cells of the olfactory bulb. *J. Cell Sci.* 7, 91–123.

Price, J.L., and Powell, T.P. (1970c). The synaptology of the granule cells of the olfactory bulb. *J. Cell Sci.* 7, 125–155.

Price, J.L., Slotnick, B.M., and Revial, M.-F. (1991). Olfactory projections to the hypothalamus. *J. Comp. Neurol.* 306, 447–461.

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

Primeaux, S.D., Wilson, M.A., Wilson, S.P., Guth, A.N., Lelutiu, N.B., and Holmes, P.V. (2003). Herpes virus-mediated preproenkephalin gene transfer in the ventral striatum mimics behavioral changes produced by olfactory bulbectomy in rats. *Brain Res.* 988, 43–55.

Prosser, R.A., Edgar, D.M., Heller, H.C., and Miller, J.D. (1994). A possible glial role in the mammalian circadian clock. *Brain Res.* 643, 296–301.

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

Q

Qu, D., Ludwig, D.S., Gammeltoft, S., Piper, M., Pelley, M.A., Cullen, M.J., Mathes, W.F., Przypek, J., Kanarek, R., and Maratos-Flier, E. (1996). A role for melanin-concentrating hormone in the central regulation of feeding behaviour. *Nature* 380, 243–247.

Quillan, J.M., Sadée, W., Wei, E.T., Jimenez, C., Ji, L., and Chang, J.K. (1998). A synthetic human Agouti-related protein-(83-132)-NH₂ fragment is a potent inhibitor of melanocortin receptor function. *FEBS Lett.* 428, 59–62.

R

Ramaekers, M.G., Verhoef, A., Gort, G., Luning, P.A., and Boesveldt, S. (2015). Metabolic and Sensory Influences on Odor Sensitivity in Humans. *Chem. Senses* bjr068.

- Ramamoorthy, P., and Whim, M.D. (2008). Trafficking and Fusion of Neuropeptide Y-Containing Dense-Core Granules in Astrocytes. *J. Neurosci.* *28*, 13815–13827.
- Ramón y Cajal S. (1897). Algo sobre la significación fisiológica de la neuroglia. *Revista Trimestral Micrografía* *1*, 3–47
- Ramón y Cajal, S. (1909). *Histologie du système nerveux de l’homme & des vertébrés* (Paris : Maloine).
- Rapps, N., Giel, K.E., Söhngen, E., Salini, A., Enck, P., Bischoff, S.C., and Zipfel, S. (2010). Olfactory deficits in patients with anorexia nervosa. *Eur. Eat. Disord. Rev.* *18*, 385–389.
- Rasmussen, E.B., and Huskinson, S.L. (2008). Effects of rimonabant on behavior maintained by progressive ratio schedules of sucrose reinforcement in obese Zucker (fa/fa) rats: *Behav. Pharmacol.* *19*, 735–742.
- Rasmussen, E.B., and Newland, M.C. (2008). Asymmetry of reinforcement and punishment in human choice. *J. Exp. Anal. Behav.* *89*, 157–167.
- Raynaud, A., Meunier, N., Acquistapace, A., and Bombail, V. (2015a). Chronic variable stress exposure in male Wistar rats affects the first step of olfactory detection. *Behav. Brain Res.* *291*, 36–45.
- Raynaud, A., Meunier, N., Dewaele, A., Grébert, D., Durieux, D., Le Bourhis, M., and Bombail, V. (2015b). Stress and olfaction: Glucocorticoids affect the first step of olfactory detection in male Wistar rat. *Psychoneuroendocrinology* *61*, 73–74.
- Reagan, L.P., Rosell, D.R., Wood, G.E., Spedding, M., Muñoz, C., Rothstein, J., and McEwen, B.S. (2004). Chronic restraint stress up-regulates GLT-1 mRNA and protein expression in the rat hippocampus: Reversal by tianeptine. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *101*, 2179–2184.
- Reichelt, W., Dettmer, D., Brückner, G., Brust, P., Eberhardt, W., and Reichenbach, A. (1989). Potassium as a signal for both proliferation and differentiation of rabbit retinal (Müller) glia growing in cell culture. *Cell. Signal.* *1*, 187–194.
- Reichenbach, A., Derouiche, A., and Kirchhoff, F. (2010). Morphology and dynamics of perisynaptic glia. *Brain Res. Rev.* *63*, 11–25.
- Ren, X. (2009). Sweet taste signaling functions as a hypothalamic glucose sensor. *Front. Integr. Neurosci.* *3*.
- Ressler, K.J., Sullivan, S.L., and Buck, L.B. (1993). A zonal organization of odorant receptor gene expression in the olfactory epithelium. *Cell* *73*, 597–609.
- Richardson, B.E., Vander Woude, E.A., Sudan, R., Thompson, J.S., and Leopold, D.A. (2004). Altered olfactory acuity in the morbidly obese. *Obes. Surg.* *14*, 967–969.
- Ritter, R.C., Slusser, P.G., and Stone, S. (1981). Glucoreceptors controlling feeding and blood glucose: location in the hindbrain. *Science* *213*, 451–452.
- Rivière, S., Soubeyre, V., Jarriault, D., Molinas, A., Léger-Charnay, E., Desmoulins, L., Grebert, D., Meunier, N., and Grosmaître, X. (2016). High Fructose Diet inducing diabetes rapidly impacts olfactory epithelium and behavior in mice. *Sci. Rep.* *6*, 34011.

- Rodnight, R.B., and Gottfried, C. (2013). Morphological plasticity of rodent astroglia. *J. Neurochem.* *124*, 263–275.
- Rodrigo, C., Zaben, M., Lawrence, T., Laskowski, A., Howell, O.W., and Gray, W.P. (2010). NPY augments the proliferative effect of FGF2 and increases the expression of FGFR1 on nestin positive postnatal hippocampal precursor cells, via the Y1 receptor. *J. Neurochem.* *113*, 615–627.
- Rodriguez, I. (2004). Pheromone receptors in mammals. *Horm. Behav.* *46*, 219–230.
- Rolls ET, Perrett DI, Caan AW, Wilson FAW (1982) Neuronal responses related to visual recognition. *Brain.* *105*:611-646
- Rolls, B.J. (1986). Sensory-specific satiety. *Nutr. Rev.* *44*, 93–101.
- Rolls, E.T. (1981). CENTRAL NERVOUS MECHANISMS RELATED TO FEEDING AND APPETITE. *Br. Med. Bull.* *37*, 131–134.
- Rolls, E.T. (1997). Taste and olfactory processing in the brain and its relation to the control of eating. *Crit. Rev. Neurobiol.* *11*, 263–287.
- Rolls, E.T. (2007). Sensory processing in the brain related to the control of food intake. *Proc. Nutr. Soc.* *66*, 96–112.
- Rolls, E.T. (2015). Taste, olfactory, and food reward value processing in the brain. *Prog. Neurobiol.* *127–128*, 64–90.
- Rolls, B.J., Roe, L.S., and Meengs, J.S. (2004). Salad and satiety: Energy density and portion size of a first-course salad affect energy intake at lunch. *J. Am. Diet. Assoc.* *104*, 1570–1576.
- Rolls, B.J., Roe, L.S., and Meengs, J.S. (2006). Larger Portion Sizes Lead to a Sustained Increase in Energy Intake Over 2 Days. *J. Am. Diet. Assoc.* *106*, 543–549.
- Rolls, E.T., Thorpe, S.J., Boytim, M., Szabo, I., and Perrett, D.I. (1984). Responses of striatal neurons in the behaving monkey. 3. Effects of iontophoretically applied dopamine on normal responsiveness. *Neuroscience* *12*, 1201–1212.
- Romer, M., Lehrner, J., Van Wymelbeke, V., Jiang, T., Deecke, L., and Brondel, L. (2006). Does modification of olfacto-gustatory stimulation diminish sensory-specific satiety in humans? *Physiol. Behav.* *87*, 469–477.
- Rossi, M., Kim, M.S., Morgan, D.G.A., Small, C.J., Edwards, C.M.B., Sunter, D., Abusnana, S., Goldstone, A.P., Russell, S.H., Stanley, S.A., et al. (1998). A C-Terminal Fragment of Agouti-Related Protein Increases Feeding and Antagonizes the Effect of Alpha-Melanocyte Stimulating Hormone *in Vivo*. *Endocrinology* *139*, 4428–4431.
- Rouach, N., Koulakoff, A., Abudara, V., Willecke, K., and Giaume, C. (2008). Astroglial Metabolic Networks Sustain Hippocampal Synaptic Transmission. *Science* *322*, 1551–1555.
- Routh V. H., McArdle J. J., Sanders N. M., Song Z., Wang R. (2007). Glucose sensing neurons, in *Handbook of Neurochemistry and Molecular Neurobiology*, eds Lajtha A., Johnson D. A., editors. (New York, NY: Springer;), 205–228.

Roux, L., Benchenane, K., Rothstein, J.D., Bonvento, G., and Giaume, C. (2011). Plasticity of astroglial networks in olfactory glomeruli. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *108*, 18442–18446.

Rowland, N.E. (2007). Food or Fluid Restriction in Common Laboratory Animals: Balancing Welfare Considerations with Scientific Inquiry. *Comp. Med.* *57*, 149–160.

Royet, J.P., Souchier, C., Jourdan, F., and Ploye, H. (1988). Morphometric study of the glomerular population in the mouse olfactory bulb: Numerical density and size distribution along the rostrocaudal axis. *J. Comp. Neurol.* *270*, 559–568.

Royet, J.P., Distel, H., Hudson, R., and Gervais, R. (1998). A re-estimation of the number of glomeruli and mitral cells in the olfactory bulb of rabbit. *Brain Res.* *788*, 35–42.

Rozovsky, I., Laping, N.J., Krohn, K., Teter, B., O’Callaghan, J.P., and Finch, C.E. (1995). Transcriptional regulation of glial fibrillary acidic protein by corticosterone in rat astrocytes in vitro is influenced by the duration of time in culture and by astrocyte-neuron interactions. *Endocrinology* *136*, 2066–2073.

Ruijschop, R.M.A.J., Boelrijk, A.E.M., de Ru, J.A., de Graaf, C., and Westerterp-Plantenga, M.S. (2008). Effects of retro-nasal aroma release on satiation. *Br. J. Nutr.* *99*, 1140–1148.

Ruijschop, R.M.A.J., Boelrijk, A.E.M., Burgering, M.J.M., de Graaf, C., and Westerterp-Plantenga, M.S. (2010). Acute effects of complexity in aroma composition on satiation and food intake. *Chem. Senses* *35*, 91–100.

Rutkoski, N.J., Fitch, C.A., Yeiser, E.C., Dodge, J., Trombley, P.Q., and Levenson, C.W. (1999). Regulation of neuropeptide Y mRNA and peptide concentrations by copper in rat olfactory bulb. *Mol. Brain Res.* *65*, 80–86.

S

Safavi-Abbasi, S., Wolff, J.R., and Missler, M. (2001). Rapid morphological changes in astrocytes are accompanied by redistribution but not by quantitative changes of cytoskeletal proteins. *Glia* *36*, 102–115.

Sahu, A. (2003). Leptin signaling in the hypothalamus: emphasis on energy homeostasis and leptin resistance. *Front. Neuroendocrinol.* *24*, 225–253.

Sakurai, T., Amemiya, A., Ishii, M., Matsuzaki, I., Chemelli, R.M., Tanaka, H., Williams, S.C., Richardson, J.A., Kozlowski, G.P., Wilson, S., et al. (1998). Orexins and orexin receptors: a family of hypothalamic neuropeptides and G protein-coupled receptors that regulate feeding behavior. *Cell* *92*, 573–585.

Saladin, R., De Vos, P., Guerre-Millot, M., Leturque, A., Girard, J., Staels, B., and Auwerx, J. (1995). Transient increase in obese gene expression after food intake or insulin administration. *Nature* *377*, 527–528.

Saper, C.B., Chou, T.C., and Elmquist, J.K. (2002). The need to feed: homeostatic and hedonic control of eating. *Neuron* *36*, 199–211.

- Savigner, A., Duchamp-Viret, P., Grosmaître, X., Chaput, M., Garcia, S., Ma, M., and Palouzier-Paulignan, B. (2009). Modulation of Spontaneous and Odorant-Evoked Activity of Rat Olfactory Sensory Neurons by Two Anorectic Peptides, Insulin and Leptin. *J. Neurophysiol.* *101*, 2898–2906.
- Schneider, R.A., and Wolf, S. (1955). Olfactory perception thresholds for citral utilizing a new type olfactorium. *J. Appl. Physiol.* *8*, 337–342.
- Schoeller, D.A., Cella, L.K., Sinha, M.K., and Caro, J.F. (1997). Entrainment of the diurnal rhythm of plasma leptin to meal timing. *J. Clin. Invest.* *100*, 1882–1887.
- Schummers, J., Yu, H., and Sur, M. (2008). Tuned Responses of Astrocytes and Their Influence on Hemodynamic Signals in the Visual Cortex. *Science* *320*, 1638–1643.
- Schwob, J.E. (2002). Neural regeneration and the peripheral olfactory system. *Anat. Rec.* *269*, 33–49.
- Serizawa, S., Ishii, T., Nakatani, H., Tsuboi, A., Nagawa, F., Asano, M., Sudo, K., Sakagami, J., Sakano, H., Ijiri, T., et al. (2000). Mutually exclusive expression of odorant receptor transgenes. *Nat. Neurosci.* *3*, 687–693.
- Serrano, A. (2006). GABAergic Network Activation of Glial Cells Underlies Hippocampal Heterosynaptic Depression. *J. Neurosci.* *26*, 5370–5382.
- Sherwood, C.C., Stimpson, C.D., Raghanti, M.A., Wildman, D.E., Uddin, M., Grossman, L.I., Goodman, M., Redmond, J.C., Bonar, C.J., Erwin, J.M., et al. (2006). Evolution of increased glia-neuron ratios in the human frontal cortex. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *103*, 13606–13611.
- Shibata, M., Mondal, M.S., Date, Y., Nakazato, M., Suzuki, H., and Ueta, Y. (2008). Distribution of orexins-containing fibers and contents of orexins in the rat olfactory bulb. *Neurosci. Res.* *61*, 99–105.
- Shibley, M.T., and Adamek, G.D. (1984). The connections of the mouse olfactory bulb: a study using orthograde and retrograde transport of wheat germ agglutinin conjugated to horseradish peroxidase. *Brain Res. Bull.* *12*, 669–688.
- Shibley, M.T., and Ennis, M. (1996). Functional organization of olfactory system. *J. Neurobiol.* *30*, 123–176.
- Shleper, M. (2005). D-Serine Is the Dominant Endogenous Coagonist for NMDA Receptor Neurotoxicity in Organotypic Hippocampal Slices. *J. Neurosci.* *25*, 9413–9417.
- Shoji, S. (1992). Glucose regulation of synaptic transmission in the dorsolateral septal nucleus of the rat. *Synapse* *12*, 322–332.
- Simard, M., and Nedergaard, M. (2004). The neurobiology of glia in the context of water and ion homeostasis. *Neuroscience* *129*, 877–896.
- Simiand, J., Keane, M., Keane, P.E., and Soubrié, P. (1998). SR 141716, a CB1 cannabinoid receptor antagonist, selectively reduces sweet food intake in marmoset. *Behav. Pharmacol.* *9*, 179–181.
- Small, D.M. (2004). Experience-Dependent Neural Integration of Taste and Smell in the Human Brain. *J. Neurophysiol.* *92*, 1892–1903.
- Smeets, P.A., Erkner, A., and De Graaf, C. (2010). Cephalic phase responses and appetite. *Nutr. Rev.* *68*, 643–655.

- Sofroniew, M.V., and Vinters, H.V. (2010). Astrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 119, 7–35.
- Song, C., and Leonard, B.E. (2005). The olfactory bulbectomized rat as a model of depression. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 29, 627–647.
- Sontheimer, H., Fernandez-Marques, E., Ullrich, N., Pappas, C.A., and Waxman, S.G. (1994). Astrocyte Na⁺ channels are required for maintenance of Na⁺/K⁺-ATPase activity. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 14, 2464–2475.
- Sørensen, L.B., Møller, P., Flint, A., Martens, M., and Raben, A. (2003). Effect of sensory perception of foods on appetite and food intake: a review of studies on humans. *Int. J. Obes.* 27, 1152–1166.
- Soria-Gómez, E., Bellocchio, L., Reguero, L., Lepousez, G., Martin, C., Bendahmane, M., Ruehle, S., Remmers, F., Desprez, T., Matias, I., et al. (2014). The endocannabinoid system controls food intake via olfactory processes. *Nat. Neurosci.* 17, 407–415.
- Spinazzi, R., Andreis, P., and Nussdorfer, G. (2005). Neuropeptide-Y and Y-receptors in the autocrine-paracrine regulation of adrenal gland under physiological and pathophysiological conditions (Review). *Int. J. Mol. Med.*
- Spreckley, E. (2015). The L-cell in nutritional sensing and the regulation of appetite. *Front. Nutr.* 2.
- Stafford, L.D., and Welbeck, K. (2011). High Hunger State Increases Olfactory Sensitivity to Neutral but Not Food Odors. *Chem. Senses* 36, 189–198.
- Stanić, D., Brumovsky, P., Fetissov, S., Shuster, S., Herzog, H., and Hökfelt, T. (2006). Characterization of neuropeptide Y2 receptor protein expression in the mouse brain. I. Distribution in cell bodies and nerve terminals. *J. Comp. Neurol.* 499, 357–390.
- Stanley, S. (2005). Hormonal Regulation of Food Intake. *Physiol. Rev.* 85, 1131–1158.
- Stanley, B.G., and Leibowitz, S.F. (1985). Neuropeptide Y injected in the paraventricular hypothalamus: a powerful stimulant of feeding behavior. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 82, 3940–3943.
- Stanley, B.G., Chin, A.S., and Leibowitz, S.F. (1985). Feeding and drinking elicited by central injection of neuropeptide Y: evidence for a hypothalamic site(s) of action. *Brain Res. Bull.* 14, 521–524.
- Stanley, B.G., Anderson, K.C., Grayson, M.H., and Leibowitz, S.F. (1989). Repeated hypothalamic stimulation with neuropeptide Y increases daily carbohydrate and fat intake and body weight gain in female rats. *Physiol. Behav.* 46, 173–177.
- Stellar, E. (1994). The physiology of motivation. 1954. *Psychol. Rev.* 101, 301–311.
- Stern, J.E., and Armstrong, W.E. (1998). Reorganization of the dendritic trees of oxytocin and vasopressin neurons of the rat supraoptic nucleus during lactation. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 18, 841–853.
- Stevens, E.R., Esguerra, M., Kim, P.M., Newman, E.A., Snyder, S.H., Zahs, K.R., and Miller, R.F. (2003). D-serine and serine racemase are present in the vertebrate retina and contribute to the physiological activation of NMDA receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 100, 6789–6794.

Stevenson, R.J. (2010). An Initial Evaluation of the Functions of Human Olfaction. *Chem. Senses* 35, 3–20.

Stolarczyk, E., Guissard, C., Michau, A., Even, P.C., Grosfeld, A., Serradas, P., Lorsignol, A., Pénicaud, L., Brot-Laroche, E., Leturque, A., et al. (2010a). Detection of extracellular glucose by GLUT2 contributes to hypothalamic control of food intake. *Am. J. Physiol. - Endocrinol. Metab.* 298, E1078–E1087.

Stolarczyk, E., Guissard, C., Michau, A., Even, P.C., Grosfeld, A., Serradas, P., Lorsignol, A., Penicaud, L., Brot-Laroche, E., Leturque, A., et al. (2010b). Detection of extracellular glucose by GLUT2 contributes to hypothalamic control of food intake. *AJP Endocrinol. Metab.* 298, E1078–E1087.

St-Pierre, J.-A., Nouel, D., Dumont, Y., Beaudet, A., and Quirion, R. (2000). Sub-population of cultured hippocampal astrocytes expresses neuropeptide Y Y1 receptors. *Glia* 30, 82–91.

Sykova, E. (2005). Glia and volume transmission during physiological and pathological states. *J. Neural Transm.* 112, 137–147.

T

Tamada, Y., Tanaka, M., Munekawa, K., Hayashi, S., Okamura, H., Kubo, T., Hisa, Y., and Ibata, Y. (1998). Neuron-glia interaction in the suprachiasmatic nucleus: a double labeling light and electron microscopic immunocytochemical study in the rat. *Brain Res. Bull.* 45, 281–287.

Tanaka, M., Shih, P.-Y., Gomi, H., Yoshida, T., Nakai, J., Ando, R., Furuichi, T., Mikoshiba, K., Semyanov, A., and Itohara, S. (2013). Astrocytic Ca²⁺ signals are required for the functional integrity of tripartite synapses. *Mol. Brain* 6, 6.

Theodosios, D.T. (2002). Oxytocin-Secreting Neurons: A Physiological Model of Morphological Neuronal and Glial Plasticity in the Adult Hypothalamus. *Front. Neuroendocrinol.* 23, 101–135.

Theodosios, D.T., and Poulain, D.A. (1993). Activity-dependent neuronal-glia and synaptic plasticity in the adult mammalian hypothalamus. *Neuroscience* 57, 501–535.

Theodosios, D.T., Poulain, D.A., and Vincent, J.D. (1981). Possible morphological bases for synchronisation of neuronal firing in the rat supraoptic nucleus during lactation. *Neuroscience* 6, 919–929.

Theodosios, D.T., Montagnese, C., Rodriguez, F., Vincent, J.-D., and Poulain, D.A. (1986). Oxytocin induces morphological plasticity in the adult hypothalamo-neurohypophysial system. *Nature* 322, 738–740.

Theodosios, D.T., Piet, R., Poulain, D.A., and Oliet, S.H.. (2004). Neuronal, glial and synaptic remodeling in the adult hypothalamus: functional consequences and role of cell surface and extracellular matrix adhesion molecules. *Neurochem. Int.* 45, 491–501.

Theodosios, D.T., Koksma, J.-J., Trailin, A., Langle, S.L., Piet, R., Lodder, J.C., Timmerman, J., Mansvelter, H., Poulain, D.A., Oliet, S.H.R., et al. (2006). Oxytocin and estrogen promote rapid formation of functional GABA synapses in the adult supraoptic nucleus. *Mol. Cell. Neurosci.* 31, 785–794.

- Theodosios, D.T., Poulain, D.A., and Oliet, S.H.R. (2008a). Activity-Dependent Structural and Functional Plasticity of Astrocyte-Neuron Interactions. *Physiol. Rev.* *88*, 983–1008.
- Theodosios, D.T., Poulain, D.A., and Oliet, S.H.R. (2008b). Activity-dependent structural and functional plasticity of astrocyte-neuron interactions. *Physiol. Rev.* *88*, 983–1008.
- Thiebaud, N., Johnson, M.C., Butler, J.L., Bell, G.A., Ferguson, K.L., Fadool, A.R., Fadool, J.C., Gale, A.M., Gale, D.S., and Fadool, D.A. (2014). Hyperlipidemic Diet Causes Loss of Olfactory Sensory Neurons, Reduces Olfactory Discrimination, and Disrupts Odor-Reversal Learning. *J. Neurosci.* *34*, 6970–6984.
- Thorens, B. (2008). Glucose sensing and the pathogenesis of obesity and type 2 diabetes. *Int. J. Obes.* *32*, S62–S71.
- Tong, J., Mannea, E., Aime, P., Pfluger, P.T., Yi, C.-X., Castaneda, T.R., Davis, H.W., Ren, X., Pixley, S., Benoit, S., et al. (2011). Ghrelin Enhances Olfactory Sensitivity and Exploratory Sniffing in Rodents and Humans. *J. Neurosci.* *31*, 5841–5846.
- van den Top, M., Lee, K., Whyment, A.D., Blanks, A.M., and Spanswick, D. (2004). Orexin-sensitive NPY/AgRP pacemaker neurons in the hypothalamic arcuate nucleus. *Nat. Neurosci.* *7*, 493–494.
- Trellakis, S., Tagay, S., Fischer, C., Rydleuskaya, A., Scherag, A., Bruderek, K., Schlegl, S., Greve, J., Canbay, A.E., Lang, S., et al. (2011). Ghrelin, leptin and adiponectin as possible predictors of the hedonic value of odors. *Regul. Pept.* *167*, 112–117.
- Tsacopoulos, M., and Magistretti, P.J. (1996). Metabolic coupling between glia and neurons. *J. Neurosci.* *16*, 877–885.
- Tsujino, N., and Sakurai, T. (2009). Orexin/Hypocretin: A Neuropeptide at the Interface of Sleep, Energy Homeostasis, and Reward System. *Pharmacol. Rev.* *61*, 162–176.
- Tucker, K., Cavallin, M.A., Jean-Baptiste, P., Biju, K.C., Overton, J.M., Pedarzani, P., and Fadool, D.A. (2010). The Olfactory Bulb: A Metabolic Sensor of Brain Insulin and Glucose Concentrations via a Voltage-Gated Potassium Channel. *Results Probl. Cell Differ.* *52*, 147–157.
- Tucker, K., Cho, S., Thiebaud, N., Henderson, M.X., and Fadool, D.A. (2013a). Glucose sensitivity of mouse olfactory bulb neurons is conveyed by a voltage-gated potassium channel: Mitral cell and Kv1.3 glucose sensitivity. *J. Physiol.* *591*, 2541–2561.
- Tucker, K., Cho, S., Thiebaud, N., Henderson, M.X., and Fadool, D.A. (2013b). Glucose sensitivity of mouse olfactory bulb neurons is conveyed by a voltage-gated potassium channel: Mitral cell and Kv1.3 glucose sensitivity. *J. Physiol.* *591*, 2541–2561.
- Tweedle, C.D., and Hatton, G.I. (1977). Ultrastructural changes in rat hypothalamic neurosecretory cells and their associated glia during minimal dehydration and rehydration. *Cell Tissue Res.* *181*, 59–72.
- Tynan, R.J., Beynon, S.B., Hinwood, M., Johnson, S.J., Nilsson, M., Woods, J.J., and Walker, F.R. (2013). Chronic stress-induced disruption of the astrocyte network is driven by structural atrophy and not loss of astrocytes. *Acta Neuropathol. (Berl.)* *126*, 75–91.

U

Ueno, M., Dobrogowska, D.H., and Vorbrodt, A.W. (1996). Immunocytochemical evaluation of the blood-brain barrier to endogenous albumin in the olfactory bulb and pons of senescence-accelerated mice (SAM). *Histochem. Cell Biol.* *105*, 203–212.

Unemura, K., Kume, T., Kondo, M., Maeda, Y., Izumi, Y., and Akaike, A. (2012). Glucocorticoids Decrease Astrocyte Numbers by Reducing Glucocorticoid Receptor Expression In Vitro and In Vivo. *J. Pharmacol. Sci.* *119*, 30–39.

Utsumi, M., Ohno, K., Onchi, H., Sato, K., and Tohyama, M. (2001). Differential expression patterns of three glutamate transporters (GLAST, GLT1 and EAAC1) in the rat main olfactory bulb. *Brain Res. Mol. Brain Res.* *92*, 1–11.

V

Valverde, F., and Lopez-Mascaraque, L. (1991). Neuroglial arrangements in the olfactory glomeruli of the hedgehog. *J. Comp. Neurol.* *307*, 658–674.

Vannucci, S.J., Maher, F., and Simpson, I.A. (1997). Glucose transporter proteins in brain: delivery of glucose to neurons and glia. *Glia* *21*, 2–21.

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

Verkhratsky, A., Orkand, R.K., and Kettenmann, H. (1998). Glial calcium: homeostasis and signaling function. *Physiol. Rev.* *78*, 99–141.

Volterra, A., and Meldolesi, J. (2005). Astrocytes, from brain glue to communication elements: the revolution continues. *Nat. Rev. Neurosci.* *6*, 626–640.

Volterra, A., Liaudet, N., and Savtchouk, I. (2014). Astrocyte Ca²⁺ signalling: an unexpected complexity. *Nat. Rev. Neurosci.* *15*, 327–335.

W

Walz, W. (2000). Role of astrocytes in the clearance of excess extracellular potassium. *Neurochem. Int.* *36*, 291–300.

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

Wang, Y., Jin, S., Sonobe, Y., Cheng, Y., Horiuchi, H., Parajuli, B., Kawanokuchi, J., Mizuno, T., Takeuchi, H., and Suzumura, A. (2014). Interleukin-1 β Induces Blood–Brain Barrier Disruption by Downregulating Sonic Hedgehog in Astrocytes. *PLoS ONE* *9*, e110024.

Wang, Y., Hsuchou, H., He, Y., Kastin, A.J., and Pan, W. (2015). Role of Astrocytes in Leptin Signaling. *J. Mol. Neurosci.* 56, 829–839.

Wang, Z.-J., Sun, L., and Heinbockel, T. (2012). Cannabinoid Receptor-Mediated Regulation of Neuronal Activity and Signaling in Glomeruli of the Main Olfactory Bulb. *J. Neurosci.* 32, 8475–8479.

Waxman, S.G. (2003). *Form and Function in the Brain and Spinal Cord: Perspectives of a Neurologist* (MIT Press).

Werther, G.A., Hogg, A., Oldfield, B.J., McKINLEY, M.J., Figdor, R., Allen, A.M., and Mendelsohn, F.A.O. (1987). Localization and Characterization of Insulin Receptors in Rat Brain and Pituitary Gland Using *in Vitro* Autoradiography and Computerized Densitometry*. *Endocrinology* 121, 1562–1570.

Williams, S.A., Blache, D., Martin, G.B., Foot, R., Blackberry, M.A., and Scaramuzzi, R.J. (2001). Effect of nutritional supplementation on quantities of glucose transporters 1 and 4 in sheep granulosa and theca cells. *Reprod. Camb. Engl.* 122, 947–956.

Wolf, F., and Kirchhoff, F. (2008). NEUROSCIENCE: Imaging Astrocyte Activity. *Science* 320, 1597–1599.

Wolff, J.R. (1970). The astrocyte as link between capillary and nerve cell. *Triangle Sandoz J. Med. Sci.* 9, 153–164.

Won, M.H., Kang, T.C., Lee, J.C., Choi, K.Y., Park, S.K., Jeong, Y.G., and Jo, S.M. (2000). Age-related change of neuropeptide Y-immunoreactive neurons in the rat main olfactory bulb. *Neurosci. Lett.* 289, 119–122.

Wooley, S.C., and Wooley, O.W. (1973). Salivation to the sight and thought of food: a new measure of appetite. *Psychosom. Med.* 35, 136–142.

Wren, A.M., Small, C.J., Ward, H.L., Murphy, K.G., Dakin, C.L., Taheri, S., Kennedy, A.R., Roberts, G.H., Morgan, D.G.A., Ghatei, M.A., et al. (2000). The Novel Hypothalamic Peptide Ghrelin Stimulates Food Intake and Growth Hormone Secretion. *Endocrinology* 141, 4325–4328.

X

Xu, J., Li, Y., Chen, W.-D., Xu, Y., Yin, L., Ge, X., Jadhav, K., Adorini, L., and Zhang, Y. (2014). Hepatic carboxylesterase 1 is essential for both normal and farnesoid X receptor-controlled lipid homeostasis: Xu, Li, et al. *Hepatology* 59, 1761–1771.

Y

Yamada, H., Okumura, T., Motomura, W., Kobayashi, Y., and Kohgo, Y. (2000). Inhibition of Food Intake by Central Injection of Anti-orexin Antibody in Fasted Rats. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 267, 527–531.

Yamaguchi, M., Manabe, H., Murata, K., and Mori, K. (2013). Reorganization of neuronal circuits of the central olfactory system during postprandial sleep. *Front. Neural Circuits* 7.

Yamashita, T., Murakami, T., Otani, S., Kuwajima, M., and Shima, K. (1998). Leptin Receptor Signal Transduction: OBRa and OBRb offaType. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *246*, 752–759.

Yang, Y., Ge, W., Chen, Y., Zhang, Z., Shen, W., Wu, C., Poo, M., and Duan, S. (2003). Contribution of astrocytes to hippocampal long-term potentiation through release of D-serine. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *100*, 15194–15199.

Yeomans, M.R. (1998). Taste, palatability and the control of appetite. *Proc. Nutr. Soc.* *57*, 609–615.

Yeomans, M.R. (2006). Olfactory influences on appetite and satiety in humans. *Physiol. Behav.* *89*, 10–14.

Yokoyama, T.K., Mochimaru, D., Murata, K., Manabe, H., Kobayakawa, K., Kobayakawa, R., Sakano, H., Mori, K., and Yamaguchi, M. (2011). Elimination of Adult-Born Neurons in the Olfactory Bulb Is Promoted during the Postprandial Period. *Neuron* *71*, 883–897.

Yu, A.S., Hirayama, B.A., Timbol, G., Liu, J., Basarah, E., Kepe, V., Satyamurthy, N., Huang, S.-C., Wright, E.M., and Barrio, J.R. (2010). Functional expression of SGLTs in rat brain. *AJP Cell Physiol.* *299*, C1277–C1284.

Z

Zhang, Y., Proenca, R., Maffei, M., Barone, M., Leopold, L., and Friedman, J.M. (1994). Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* *372*, 425–432.

Zigman, J.M., and Elmquist, J.K. (2003). Minireview: From Anorexia to Obesity—The Yin and Yang of Body Weight Control. *Endocrinology* *144*, 3749–3756.

Zilstorff-Pedersen, K. (1955). Olfactory threshold determinations in relation to food intake. *Acta Otolaryngol. (Stockh.)* *45*, 86–90.

Zonta, M., Angulo, M.C., Gobbo, S., Rosengarten, B., Hossmann, K.-A., Pozzan, T., and Carmignoto, G. (2002). Neuron-to-astrocyte signaling is central to the dynamic control of brain microcirculation. *Nat. Neurosci.* *6*, 43–50.

Zschocke, J., Bayatti, N., Clement, A.M., Witan, H., Figiel, M., Engele, J., and Behl, C. (2005). Differential Promotion of Glutamate Transporter Expression and Function by Glucocorticoids in Astrocytes from Various Brain Regions. *J. Biol. Chem.* *280*, 34924–34932.

Zukerman, S., Touzani, K., Margolskee, R.F., and Sclafani, A. (2009). Role of Olfaction in the Conditioned Sucrose Preference of Sweet-Ageusic T1R3 Knockout Mice. *Chem. Senses* *34*, 685–694.

Article

RESEARCH ARTICLE

Fasting induces astroglial plasticity in the olfactory bulb glomeruli of rats

Virginie Dumas-Meyer¹ | Gaëlle Champeil-Potokar¹ | Catherine Chaumontet² |
 Patrice Dahirel¹ | Catherine Papillon¹ | Patrice Congar¹  | Isabelle Denis¹ 

¹NBO UR1197, INRA, Université Paris-Saclay, Jouy-en-Josas, 78350, France

²PNCA, UMR914 INRA/AgroParisTech, Université Paris-Saclay, Paris, 75005, France

Correspondence

Dr. Isabelle DENIS or Dr. Patrice CONGAR, INRA, UR1197 Neurobiologie de l'Olfaction, F-78352 Jouy-en-Josas, France. Email: isabelle.denis@inra.fr or patrice.congar@inra.fr

Funding information

INRA department AlimH (Human Nutrition) and department PHASE (Animal Physiology and Livestock Systems), PhD fellowship VDM

Abstract

The detection of food odors by the olfactory system, which plays a key role in regulating food intake and elaborating the hedonic value of food, is reciprocally influenced by the metabolic state. Fasting increases olfactory performance, notably by increasing the activity of olfactory bulb (OB) neurons. The glutamatergic synapses between olfactory sensory neurons and mitral cells in the OB glomeruli are regulated by astrocytes, periglomerular neurons, and centrifugal afferents. We compared the expansion of astroglial processes by quantifying GFAP-labeled areas in fed and fasted rats to see whether OB glomerular astrocytes are involved in the metabolic sensing and adaptation of the olfactory system. Glomerular astroglial spreading was much greater in all OB regions of rats fasted for 17 hr than in controls. Intra-peritoneal administration of the anorexigenic peptide PYY₃₋₃₆ or glucose in 17 hr-fasted rats respectively decreased their food intake or restored their glycemia, and reversed the fasting-induced astroglial spreading. Direct application of the orexigenic peptides ghrelin or NPY to OB slices increased astroglial spreading, whereas PYY₃₋₃₆ resulted in astroglial retraction, in agreement with the *in vivo* effects of fasting and satiety on glomerular astrocytes. Thus the morphological plasticity of OB glomerular astrocytes depends on the metabolic state of the rats and is influenced by peptides that regulate food intake. This plasticity may be part of the mechanism by which the olfactory system adapts to food intake.

KEYWORDS

Astrocytes, neurophysiology, nutritional state, olfactory bulb, plasticity

1 | INTRODUCTION

Astrocytes contribute to the regulation of neurotransmission by influencing energy supply, neurotransmitter recycling, control of extracellular homeostasis, synapses formation and consolidation, and by releasing gliotransmitters (Papouin, Dunphy, Tolman, Foley, & Haydon, 2017). The impact of astroglia on neurotransmission depends on the extent of the contact between neurons and astrocytes, which varies widely between brain areas and neuronal compartments (Matyash & Kettenmann, 2010). Astrocytes adjust their coverage of neuron surfaces and synapses in response to environmental or physiological changes by deploying or retracting their main and peripheral processes (Reichenbach, Derouiche, & Kirchhoff, 2010). This morphological

plasticity plays an active role in situations requiring adaptive changes in neurotransmission, such as oxytocin release by magnocellular neurons in the supraoptic nuclei (SON) in response to suckling or parturition (Theodosis, Poulain, & Oliet, 2008), the light synchronization of the circadian clock in the suprachiasmatic nuclei (SCN) (Becquet, Girardet, Guillaumond, François-Bellan, & Bosler, 2008; Lavalie, Begue, Papillon, & Vilaplana, 2001), or the preovulatory release of GnRH by perisuprachiasmatic neurons (Gerhold & Wise, 2006). The extent of astroglial changes in these structures contributes to establish the pattern of neurotransmission specific of a physiological state. This interplay between changes in astrocyte deployment and neuron excitability confers a metaplasticity to the neurotransmission processes monitoring vital body functions (circadian rhythm, reproduction, water and food intake, sleep-wake), or supporting cognitive functions (learning and memory) (Ben Achour & Pascual, 2010; Jones, 2015).

Patrice Congar and Isabelle Denis contributed equally and co-supervised this work.



Such an interplay could well occur in neurosensory systems in which both structural and functional plasticity have been reported (Abraham, Vincis, Lagier, Rodríguez, & Carleton, 2014). One important example of sensory plasticity is the modulation of olfactory sensitivity involved in food intake regulation. Olfactory neural processing is closely linked to the animal's nutritional status. The olfactory system is more active (Chaput & Holley, 1976; Pager, Giachetti, Holley, & Le Magnen, 1972; Prud'homme et al., 2009, Aimé et al., 2007) in starving animals, whereas satiety reduces both olfactory activity and acuity (Aimé et al., 2007; Chaput & Holley, 1976; Duclaux, Feisthauer, & Cabanac, 1973; Pager et al., 1972; Prud'homme et al., 2009). These changes in olfaction contribute to the sensations of hunger and satiety and play a key role in triggering and terminating food intake. This has been known for several decades, but the signaling systems and underlying mechanisms have been explored only recently. A growing body of evidence suggests that metabolic factors modulate the first steps by which rodents detect odor, within the olfactory mucosa and bulb (Palouzier-Paulignan et al., 2012). The activity of OB neurons is influenced by metabolic hormones, including orexins and leptin (Prud'homme et al., 2009), insulin (Aimé et al., 2012), adiponectin (Loch, Heidel, Breer, & Strotmann, 2013), and ghrelin (Loch, Breer, & Strotmann, 2015).

The OB is the first relay in odor information processing and plays a pivotal role in olfactory plasticity. Astrocytes are remarkably important in this structure ensuring signal transmission from olfactory sensory neurons (OSNs) to central areas. They support the generation and migration of new neurons through the rostral migratory stream (Gengatharan, Bammann, & Saghatelian, 2016), control neurovascular coupling (Otsu et al., 2015; Petzold, Albeanu, Sato, & Murthy, 2008), help protect against infections (Detje et al., 2015), and modulate oscillations in the neuronal network (Martin et al., 2012; Roux et al., 2015). Astrocytes are particularly important in the glomerular layer, where the axons of OSNs form synapses with the dendrites of mitral/tufted cells (projecting to the olfactory cortex) and periglomerular neurons. Glomerular astrocytes delineate the shell of a glomerulus or enter the core, deploying a profuse process meshwork within the glomeruli (Bailey & Shipley, 1993; Theofilas, Steinhäuser, Theis, & Derouiche, 2017). Chao, Kasa, and Wolff, (1997) analyzed the interface between neurons and astroglia in rat OB glomeruli by electron microscopy. No astroglial processes were found in the sensory synapses of the neuropil (involving OSN axons), but they were mostly associated with nonsensory synapses (between mitral cell dendrites and periglomerular neurons or centrifugal projections reaching glomeruli). They also showed that the density of the astroglial network varies between glomeruli, depending on the ratio of sensory and nonsensory synapses. This partitioning of the astroglial synaptic coverage in the glomeruli and the variations in its extent suggest that astrocytes could specifically monitor the influence of nonsensory synapses (i.e., those modifying the sensory inputs according to local and central information) on the glomerular neuropil, in a plastic manner. Nevertheless, two studies have also suggested functional interactions between glomerular sensory synapses and astrocytes (Doengi, Deitmer, & Lohr, 2008; Droste et al., 2017).

We postulated that the metabolic state of the animal acts via the morphological plasticity of the astrocytes within the glomeruli to influence the integration of the olfactory signal in the OB. As a result, the extent of astroglial coverage in the glomeruli adapts the olfactory signal to the animal's hunger or satiety.

We tested this hypothesis by analyzing the extent of glial fibrillary acidic protein (GFAP) immunolabeling in the OB glomeruli of fed and fasted rats, and compared different fasting times. A within-physiological-range fast (17 hr) induced an overall 44% increase in the area covered by astroglia within the glomeruli in the three sub-regions of the olfactory bulb (ventral, medial and dorsal). Glucose and the anorexigenic pancreatic peptide YY₃₋₃₆ (PYY₃₋₃₆; i.p. injections) reversed this astroglial spreading in fasted rats, whereas injections of the orexigenic hormone ghrelin induced it in fed rats. Finally, we evaluated and confirmed the local impact of these effectors on astroglial plasticity by *ex-vivo* treatment of acute OB slices and extended our study to the neuropeptide Y (NPY), one of the most abundant orexigenic peptides in the OB.

2 | MATERIALS AND METHODS

2.1 | Animals

All experiments were carried out on young adult (5–7 weeks old) male Wistar rats born in our animal care facilities in accordance with the European Communities Council Directive (September 22, 2010; 2010/63/UE) and in conformity with the Guidelines of the French government for operative procedures and animal care (February 1, 2013; Décret n° 2013-118). Experimental animal procedures were approved by the ethics committee for experiments with animals COMETHEA 45 (agreement #14-30) and by the French Ministry of National Education, Higher Education and Research (agreement # 2015082516521842v1 (APAFIS#1517)). I. D. and P. C. hold the Individual Authorization for Performing Experiments in Animals, including the animal experiments conducted in the present study, provided by the Prefecture des Yvelines (France), according to French and European laws (agreements #78-150 and #78-154). Rats were kept under controlled conditions of light (12 hr light/12 hr dark, lights on at 07:00) and temperature (22°C) with free access to pellet food (M25, Dietex, Saint-Gratien, France) and tap water. For all *ex-vivo* experiments, rats were euthanized at the beginning of the light phase (9:30-10:30).

2.2 | Diet protocols and evaluation of metabolic parameters

The effects of fasting were determined by weighing the rats and measuring their basal glycemia (blood obtained by tail vein snipping, using a standardized glucometer; Accu-Chek Performa (Roche Diabetes Care)). Food, but not water, was withheld from fasted rats for 48 hr, 24 hr and 17 hr before tests/experiments, which were performed at the same hour of the morning for all groups of rats. Fed rats had free access to pellet food.

Fed and fasted rats were weighed, and their glycemia measured, 48 hr before and on the day of the experiment/sacrifice. Their interest in food odor was then tested (see hidden food sniffing test below), or they were euthanized for tissue collection (blood, OB, and hypothalamus). Trunk blood samples were collected into tubes containing EDTA (VACUETTE®, Greiner bio-one) at the time of euthanasia and centrifuged at 3,000g for 10 min at 4°C. Plasma samples were stored at –80°C. Leptinemia was evaluated from plasma using the Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay (Rat leptin ELISA kit, Crystal Chem. Inc., Netherlands).

2.3 | Hidden food sniffing test

This test (adapted from Prud'homme et al., 2009) was designed to evaluate the motivation of the rats (sniffing activity) for a tea ball containing food pellets. Three hours before the test (corresponding to the last 3 hr of fasting for fasted rats), each rat was placed in a clean cage in the test room for habituation and given only water (food was removed from the fed rat cages). A tea ball containing food pellets was hidden in the deep litter (sawdust) of the clean cage before the rat was placed in the cage. The time the rat spent finding, then sniffing the tea ball (sniffing time) was recorded for 15 min.

2.4 | Orexigenic/anorexigenic/glucose treatment

To evaluate the effects of different metabolic factors 17 hr-fasted rats were given anorexigenic factors (glucose, leptin, and PYY_{3–36}), and fed rats were given ghrelin (orexigenic), by intraperitoneal (i.p.) injection. Glucose (2 g/kg), leptin (25 µg/kg; Clinisciences, France), PYY_{3–36} (100 µg/kg; Bachem, Germany), or ghrelin (40 µg/kg; PolyPeptide, France) were diluted in physiological saline (injection volume 1 ml/kg). Fed or 17 hr-fasted control rats were given i.p. vehicle (physiological saline). Part of the rats were used to measure food intake over 1 hr after injection (for peptide or vehicle injected rats) or glycemia 1 hr after injection (for glucose or vehicle injected rats). The other part of the rats were killed 1 hr after injections (without refeeding) and fresh tissue (OB and hypothalamus) was taken and fixed by immersion in freshly prepared 4% paraformaldehyde (PFA) in 0.1 M phosphate-buffered saline (PBS) (immunohistochemistry) or rapidly frozen in liquid nitrogen (mRNAs, proteins).

2.5 | OB slices preparation and treatments

Male Wistar rats (5–7 weeks old) were beheaded, the brain with the OB was carefully removed and immediately placed in ice cold solution containing (mM): 250 sucrose, 2 KCl, 7 MgCl₂, 0.5 CaCl₂, 1.2 NaH₂PO₄, 26 NaHCO₃ and 11 glucose, saturated with 95:5% O₂:CO₂, pH 7.4, ~310 mOsmol/L. Coronal slices (250 µm) were extemporaneously cut using a VT1200S vibratome (Leica Microsystems), then placed in heated (37°C) oxygenated artificial cerebrospinal fluid (ACSF) solution containing (mM): 126 NaCl, 3.5 KCl, 1.2 NaH₂PO₄, 1.3 MgSO₄, 2 CaCl₂, 26 NaHCO₃ and 11 glucose, saturated with 95:5% O₂:CO₂, pH 7.4, ~310 mOsmol/L for 30–45 min. The slices were allowed to cool to room temperature in ACSF w/o orexigenic/anorexigenic peptides (see below) for 1 h, then fixed for 1 hr in freshly prepared 4% PFA in

0.1 M PBS. The 1 hr duration of incubation with peptides was chosen because the duration of postprandial peak of glycemia, NPY, ghrelin, PYY or leptin release, usually does not exceed 1 h, and the peptides effects were also observed 1 hr after i.p. injection in vivo.

2.6 | Orexigenic/anorexigenic treatments of the OB slices

The effect of hypoglycemia was assessed by incubating OB slices in low-glucose ACSF solutions, one containing 5 mM glucose and the other 2.5 mM glucose (normal ACSF contains 11 mM glucose). The effects of peptides were assessed by incubating OB slices in oxygenated ACSF containing ghrelin (30 nM) or NPY (1 µM) (orexigenic context) or PYY_{3–36} (100 nM) or leptin (100 nM) (anorexigenic context).

2.7 | Immunohistochemistry (IHC)

Rats were deeply anaesthetized with sodium pentobarbital (CEVA Santé, Libourne, France; 120 mg/kg) and perfused transcardially with 0.9% saline containing 1% nitrite at 37°C, followed by freshly prepared 4% PFA in 0.1 M PBS (pH 7.4). OB were carefully dissected, postfixed in paraformaldehyde for 4 hr at room temperature, then cryoprotected with sucrose (30%) and 20 µm thick serial horizontal sections cut on a cryostat. These sections were mounted on slides and stored at –20°C.

The morphological changes of astrocytes in OB sections and slices were studied by labeling GFAP by 1 hr incubation with a monoclonal Cy3-anti-GFAP antibody (Sigma, France) diluted 1:1000 in PBS-Triton-bovine serum albumin (BSA) 0.2%, after blocking nonspecific sites with 0.1M PBS + 0.3% Triton X-100 + 2% BSA for 2 h. Cell nuclei were simultaneously labeled with bis-benzimide (0.5 µg/ml, Hoechst 33258, Sigma, France). Preparations were mounted in fluorescence mounting medium (DAKO, Agilent Technologies, France).

2.8 | Western blotting

The amounts of three specific glial marker proteins, GFAP, glutamate-aspartate transporter (GLAST) and glutamine synthetase (GS), were measured by immunoblotting as previously described (Champeil-Potokar, Hennebelle, Latour, Vancassel, & Denis, 2015). OBs were homogenized in radioimmunoprecipitation assay buffer containing anti-proteases (protease inhibitor cocktail tablets, Roche Diagnostics, France), assayed for protein contents, diluted in sample buffer, separated by sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis (4–15% gradient Tris-HCl-polyacrylamide gels, BioRad, France) and transferred to polyvinylidene fluoride membranes. The membranes were incubated in Tris-buffered saline/Tween-20 (TBS/T) (20 mM Tris HCl, 137 mM NaCl, and 0.1% Tween-20, pH 7.6) containing 5% dried milk overnight at 4°C with the appropriate primary antibodies (Anti-GFAP 1:1000, Sigma, France; Anti-GS 1:500, Merck Millipore, France; Anti-GLAST 1:1000, Abcam, France) then with the corresponding HRP-conjugated secondary antibody (anti-rabbit HRP-conjugated 1:30 000; anti-mouse HRP-conjugated 1:60 000; Jackson ImmunoResearch Europe Ltd, UK). Immunoreactive bands were detected by enhanced chemiluminescence (Clarity detection kit, BioRad, France), analyzed

using a camera connected to image analysis software (AIDA, Raytest, France) and normalized to glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH, Santa Cruz Biotechnology, Inc., Germany) or β -actin (Sigma, France).

2.9 | Images processing and GFAP analysis

Astrocyte morphology was quantified by analyzing Z-stack acquired images of OB sections and slices (see below) with Image J software. The GFAP area was quantified in each Regions Of Interest (ROI) delimiting the internal area of the glomerulus (along the inner border of the periglomerular cells nuclei), using an automatic thresholding method (Threshold: "Li" algorithm), without any pretreatment of the images, and normalized to the corresponding glomerular (ROI) surface.

2.10 | OB sections

IHC images from OB sections (thickness 20 μ m) were acquired on a high capacity digital slide fluorescence scanner (Pannoramic SCAN P150, 3D HISTECH) at 20 \times resolution, using the extended focus function scanner to generate images with extended depth of field from acquired Z-stacks (21 images, 0.4 μ m interval, 8 μ m total thickness).

The skeleton of the GFAP processes within the ROI was extracted from binary images using Skeletonize (2D/3D), after removing background (Rolling ball radius: 10 pixels), and analyzed using the Image J plugin "Analyze Skeleton" (Arganda-Carreras, Fernández-González, Muñoz-Barrutia, & Ortiz-De-Solorzano, 2010), which tags all pixels of the "skeleton", counts all the intersections (processes superposition or branching points, which are counted similarly in these stacked images), the branches, and measures their mean length (between two intersections). This analysis gives indexes of the reticulation level of the astrocyte processes within glomeruli.

In addition, the number of glomerular astrocytes was evaluated by counting the GFAP-labeled stellate densifications (regrouping three or more processes), considered as astrocytes bodies, in the glomerular layer (double counting in a blind manner) (Matsutani & Leon, 1993).

2.11 | OB slices

IHC image-stacks from OB slices (thickness 250 μ m) were acquired using a 40 \times oil-immersion objective (UAPO 40XOI3/340, NA, 0.65-1.35) on an Olympus IX71 inverted microscope, equipped with a fast illumination MT20 system (Olympus, France) and an Orca ER Hamamatsu cooled CCD camera (Hamamatsu Photonics, France), both controlled by Xcellence RT software (Olympus Soft Imaging Solutions – OSIS, Germany).

Images background was removed in Image J software (Rolling ball radius: 10 pixels) and Z-stacks were projected along the axis perpendicular to the image plane to a 2D output image, each of whose pixels contained the maximum value over all images in the stack, at any particular pixel location (maximum intensity projection).

Illustrative images were cropped, resized, rotated, merged, and adjusted for color, contrast and brightness using Image J, for presentation, but their content was never altered.

2.12 | Hypothalamic RNA isolation and real-time quantitative polymerase chain reaction (qRT-PCR)

Total RNA was extracted from each hypothalamus using the TRIzol reagent (Invitrogen™/ThermoFischer Scientific, France), assayed using a nanodrop spectrophotometer at 260 nm, and checked by electrophoresis on agarose gel transcription and visualization of the 28S and 18S ribosomal RNA bands. RNA (0.4 μ g) was retro-transcribed to synthesize cDNA using the High Capacity cDNA Archive kit (Applied Biosystems™/ThermoFischer Scientific, France). Real time PCR was performed to measure gene expression on an ABI 7300 (Applied Biosystems™/ThermoFischer Scientific, France) using Power SYBR GREEN PCR MIX (Applied Biosystems™/ThermoFischer Scientific, France). We studied the mRNA encoding proteins involved in food intake regulation. The primer sequences of genes were designed with Primer Express software (see Table 1, Supporting Information S4). RT-PCR was performed using 5 ng (2.5 μ l) cDNA plus 7.5 μ l reagent mix containing RNase-free water, PCR mix, forward and reverse primers. Negative controls (without RTase or RNA) were used to detect any contamination. The threshold (CT) was set with a constant value for all the genes and samples to quantify the mRNA concentration, and gene expression was calculated as $2^{-\Delta CT}$, where $\Delta CT = CT_{Gene} - CT_{18S}$.

2.13 | Statistical analysis

The group data in the text and figures are means \pm standard error of the mean (SEM). GFAP data were analyzed using the permutation-based (5000 permutations) equivalent of a multivariate nonparametric statistical test, with Bonferroni correction for multiple comparisons of mean tests, using R open source statistical software. We used $p < 0.05$ to indicate significant differences ($p < 0.05$ (*); $p < 0.01$ (**); $p < 0.001$ (***)).

3 | RESULTS

3.1 | Fasting enhances astroglial coverage in olfactory bulb glomeruli

3.1.1 | Glomerular astroglial coverage

We compared the glomerular astroglial coverage (extent of GFAP immunolabeling) in fed and 17 hr, 24 hr, and 48 hr-fasted rats, in three regions of the OB (dorsal, medial and ventral) that may support functional compartmentalization (Mori & Sakano, 2011). The average GFAP-labeled area in the glomeruli, overall the OB regions, was $28.3 \pm 0.8\%$ of the glomerular area in fed rats and was significantly enhanced (to $40.7 \pm 1.3\%$ of the glomerular area, in average overall the OB regions) in 17 hr-fasted rats, similarly in dorsal ($42.1 \pm 2.2\%$), medial ($39.9 \pm 2.8\%$) and ventral ($40.1 \pm 2.0\%$) OB (Figure 1c). It was also significantly enhanced in the ventral ($38.4 \pm 2.7\%$) and medial ($38.2 \pm 1.8\%$) glomeruli, but not in the dorsal ones ($34.5 \pm 1.9\%$), in 24 hr-fasted rats. In contrast, fasting for 48 hr did not change the glomerular GFAP-labeled area in any OB region (Figure 1c). Thus, the effect of fasting on the changes in glomerular GFAP density seems to decrease with its duration.

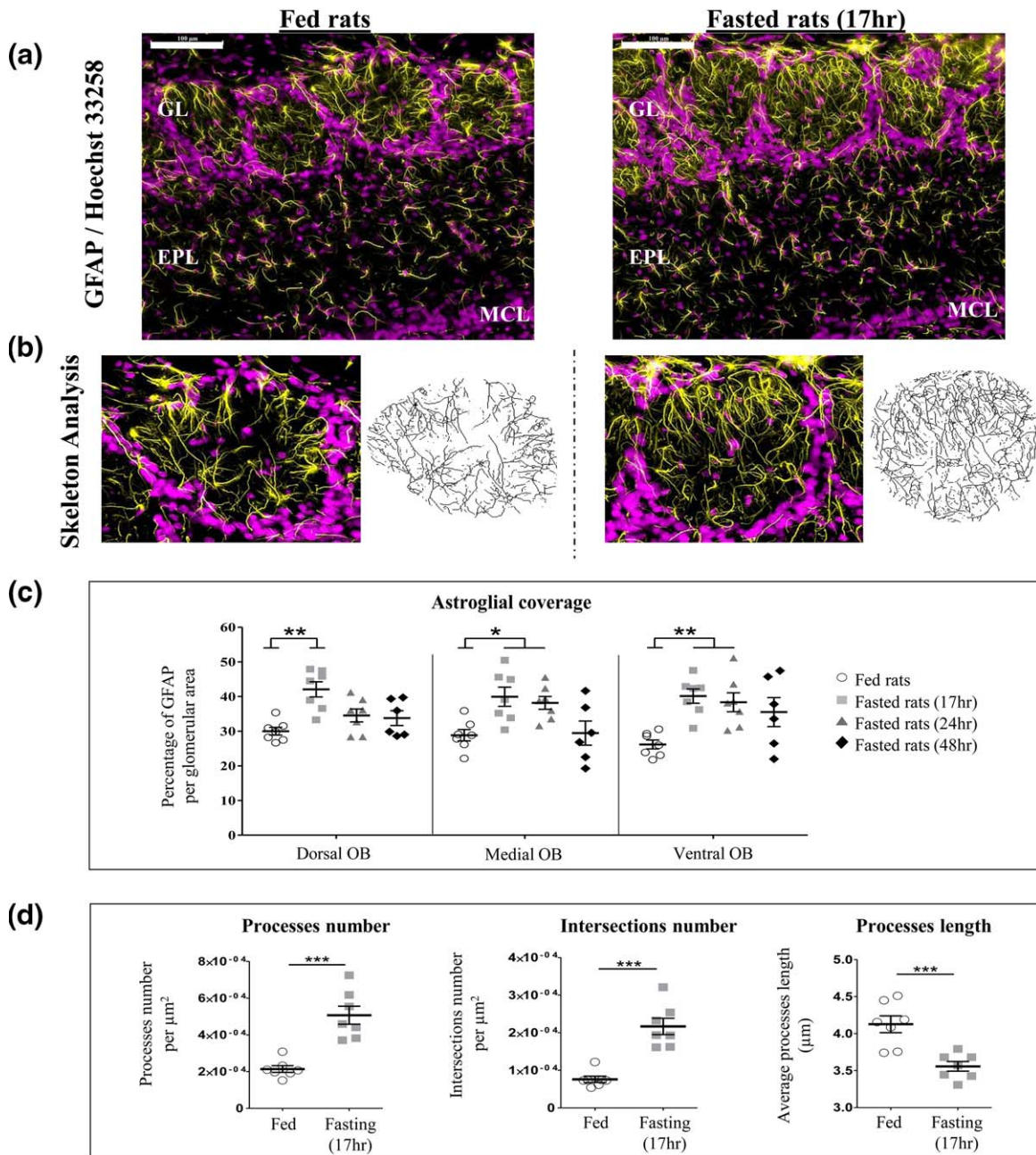


FIGURE 1 Fasting enhances astroglial coverage in olfactory bulb glomeruli. (a) Immunohistochemical identification of the astrocyte marker GFAP (yellow) in the glomerular region of OB of fed (left) and fasted (17 hr; right) rats. Cell nuclei were counterstained with Hoechst 33258 (purple) to delineate glomeruli. (b) Skeleton analysis of astroglial arborization, glomerular GFAP labeling in the OB of fed (left) and fasted (right) rats. (c) Quantitative glomerular GFAP labeling in the dorsal, medial and ventral regions of the OB in fed and fasted (17, 24 and 48 hr) rats, expressed as a percentage of the glomerular area (mean \pm SEM). Quantifications were done on 40–60 glomeruli/section, 2–3 sections per OB region for each rat, $n = 6–7$ rats per condition, $p < 0.05$ (*), $p < 0.01$ (**). (d) Skeleton analysis showing the complexity of the GFAP-labeled glomerular astrocyte network in fed and fasted (17 hr) rats. The average number of branches (left), number of intersections (middle) and length of the branches (right) per glomerulus were measured (mean \pm SEM). Measurements were done on 2–3 glomeruli/section, 1 section per OB region for each rat, $n = 7$ rats per condition, ($p < 0.001$ (***)) [Color figure can be viewed at wileyonlinelibrary.com]

The changes in astroglial coverage induced by fasting were restricted to the glomerular region, as fasting had no significant effect on the GFAP labeling in the external plexiform layer (Supporting Information S1).

We further qualified the effect of fasting on astroglial density by skeleton analysis (Arganda-Carreras et al., 2010) of the GFAP labeling

in a selected subset of ventral glomeruli in fed and 17 hr-fasted rats. This method analyses the reticulation of the astroglial network by delineating the GFAP-labeled processes (Figure 1b). The fed rats glomeruli displayed $2.1 \cdot 10^{-4} \pm 1.8 \cdot 10^{-5}$ branches and $7.6 \cdot 10^{-5} \pm 8.2 \cdot 10^{-6}$ intersections per μm^2 , while the average branch length was $4.1 \pm 0.1 \mu\text{m}$. The fasted rats had 134.8% more GFAP-labeled branches and

187.5% more intersections, but 13.8% shorter branches than fed rats, meaning that the increased GFAP-labeled area is associated to more numerous astrocyte processes within glomeruli (Figure 1d). The

increased astroglial coverage was not due to change in the number of astrocytes in the glomerular layer, which was similar in fed (4.22 ± 0.29 astrocytes/glomerulus) and 17 hr-fasting rats (4.5 ± 0.36 astrocytes/glomerulus). Then, the fasting-induced increase in the GFAP-labeled area in the OB reflects an increase in the reticulation of the astroglial network.

The astroglial spreading was not linked to changes in the amount of the major markers of astroglial phenotype, GFAP, GLAST, and GS, which were similar in fed and fasted rats OB homogenates (western blot analysis in Supporting Information S2). Since the size of the numerous OB glomeruli varies greatly, we measured the size of the glomeruli (area delimited by the periglomerular cell nuclei) studied for GFAP quantification in fed and fasted rats. The glomeruli in the ventral OB were slightly but significantly larger than those in the other two regions. However, the glomeruli in each OB region of fed and fasted rats were similar in size (Supporting Information S3).

3.1.2 | Fasting characterization

As expected, fasting induced significant weight loss, similar after 17 hr ($6.4 \pm 0.3\%$ loss) and 24 hr ($6.8 \pm 1.0\%$ loss) but greater after 48 hr ($17.9 \pm 1.1\%$ loss) fast, while fed rats gained $8.9 \pm 1.4\%$ weight over 48 hr (Figure 2a). In contrast, all fasting durations had similar lowering effects on glycemia: from 137.8 ± 5.1 mg/ml (fed rats) to 94.3 ± 3.5 mg/ml (17 hr-fasting), 93.2 ± 6.6 mg/ml (24 hr-fasting) and 81.83 ± 4.3 mg/ml (48 hr-fasting) (Figure 2b). They also significantly reduced the plasma leptin concentration, with no difference between the three fasting durations (Figure 2c). We used an olfactory-driven behavioral test to evaluate the food seeking motivation of the rats. All groups found the hidden food-containing tea ball in a similar time-range (fed: 54 ± 26 s, 17 hr-fasting: 30 ± 13 s, 24 hr-fasting: 89 ± 52 s, 48 hr-fasting: 78 ± 44 s), with a very high individual variability suggesting that the test was not sensitive enough to discriminate for olfactory sensitivity differences between groups. After finding the tea-ball, fed rats spent a long time playing around and exploring their environment, while fasted rats were clearly more focused on the food odor. Fasted rats spent around 30% of the time sniffing the tea ball, while fed rats spent only around 4% of the time sniffing (Figure 2d). No difference was observed between the three fasting durations.

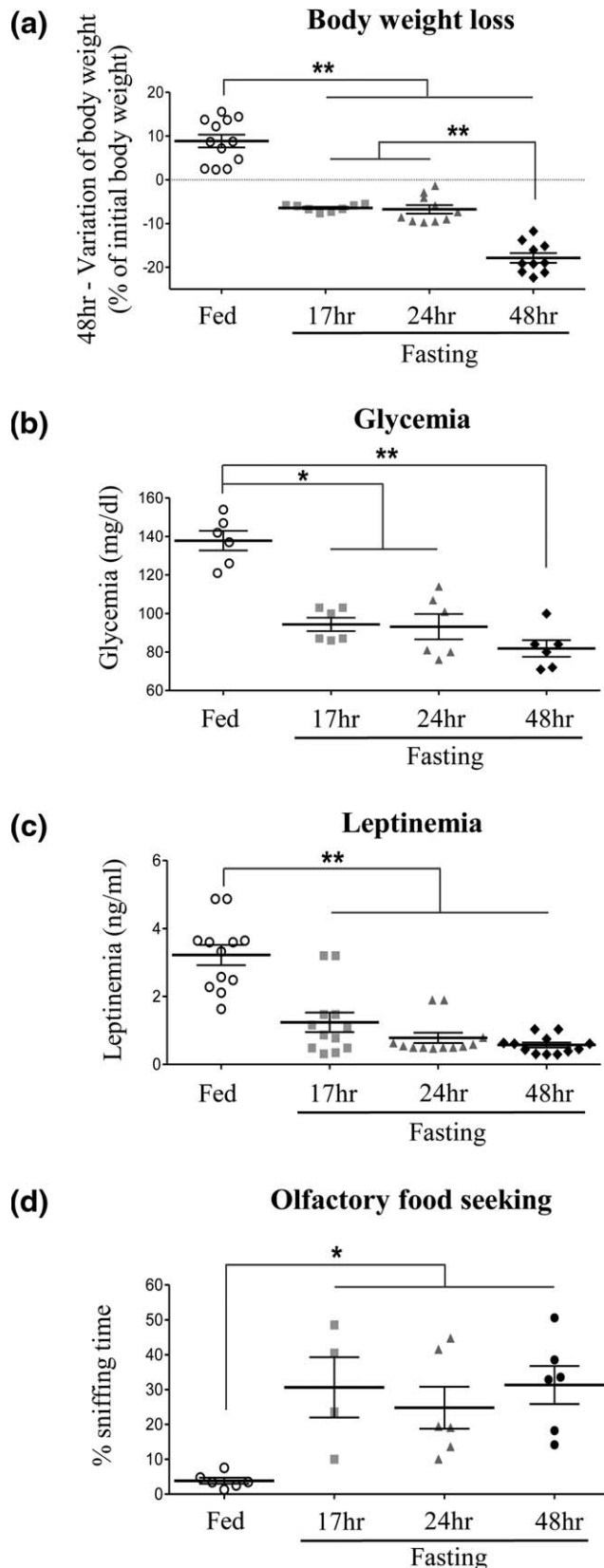


FIGURE 2.

FIGURE 2 Effects of gradual fasting durations (17, 24, and 48 hr) on body weight, glycemia, leptinemia, and food seeking behavior.

(a) Variations in average body weight over the last 48 h, as percentage of initial body weight, in fed, 17 hr-, 24 hr-, and 48 hr-fasted rats. Values are means \pm SEM ($n = 10$ –12 rats per condition), $p < 0.05$ (*), $p < 0.01$ (**). (b) Changes in average glycemia (mg/dL) in the blood of fed, 17 hr-, 24 hr-, and 48 hr-fasted rats. Values are means \pm SEM ($n = 6$ rats per condition), $p < 0.05$ (*). (c) Average plasma leptinemia (ng/ml) in fed, 17 hr-, 24 hr-, and 48 hr-fasted rats. Values are means \pm SEM ($n = 12$ rats per condition), $p < 0.05$ (**). (d) Olfactory-driven food-seeking behavior of fed, 17 hr-, 24 hr-, and 48 hr-fasted rats. Food seeking interest/motivation was assessed by measuring the percent time spent sniffing a tea ball containing food pellets (for 15 min). Values are means \pm SEM ($n = 4$ –6 rats per condition), $p < 0.05$ (*)

We assessed the activation of the arcuate nucleus neurons involved in regulating food intake in fed and 17 hr-fasted rats by quantifying the mRNAs encoding hypothalamic neuropeptides (and neuropeptides receptors): neuropeptide Y (NPY), agouti-related protein (AgRP), pro-opiomelanocortin (POMC), cocaine- and amphetamine-regulated transcript (CART), corticotropin-releasing hormone (CRH), neuropeptide Y2 receptor (Y2R) and melanocortin 4 receptor (MC4R). As expected, there was 56% more of the mRNAs encoding the orexigenic neuropeptide NPY in fasted rats than in fed ones (Table 1, Supporting Information S4, $p < 0.05$), confirming the well-known activation of NPY neurons of the arcuate nucleus in hungry animals (Schwartz, Woods, Porte, Seeley, & Baskin, 2000). We also found 36% more of the mRNAs encoding the anorexigenic neuropeptide CRH in fasted rats than in fed ones ($p < 0.05$). CRH, released by neurons of the paraventricular nucleus, is the first element of the hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis, which activation contributes to maintain hepatic glycogene stocks and glycemia during fasting (Majzoub, 2006). The mRNAs of the other hypothalamic factors were not altered by fasting (Table 1, Supporting Information S4).

We next studied the effects of different metabolic factors, either injected *in vivo* to fed or 17 hr-fasted rats, or applied *ex vivo* on acute OB slices, to identify the factors and mechanisms involved in the fasting-induced astroglial spreading in OB glomeruli.

3.2 | Anorexigenic context in vivo: glucose and PYY₃₋₃₆, but not leptin, reverse glomerular astroglial spreading in fasted rats

Glycemia is one of the most rapidly changing metabolic markers, rising after food intake, and falling after starvation. We compared the glycemia, OB glomerular GFAP-labeling, and hypothalamic factor mRNAs in fed, fasted (injected with physiological saline) and glucose-injected fasted rats, 1 hr after injection. Glycemia fell down to 76.5 ± 4.3 mg/dl in fasted rats (vs 129.6 ± 2.6 mg/dL in fed rats, $p < 0.01$), and was restored to 120.1 ± 5.5 mg/dL in fasted rats injected with glucose (not different from fed rats) (Figure 3a left). In this experimental series, the average percentage GFAP-covered area was $36.9 \pm 2.6\%$ in fasted rats and was significantly reduced to $23.9 \pm 1.9\%$ in all OB regions in fasted rats injected with glucose (Figure 3a right). Glucose injection did not alter the fasting-induced increase in NPY mRNAs, while it reversed the fasting-induced increase in CRH mRNAs (CRH mRNAs were similar in glucose-injected fasting rats and in fed rats), indicating that restoring the glycemia was sufficient to abolish the fasting-induced HPA activation (which is involved in the metabolic adaptation to fasting) (Table 1, Supporting Information S4).

Thus, glycemia was restored 1 hr after *i.p.* glucose injection, and the fasting-induced astroglial spreading in fasted rats was reversed, while the hypothalamic neuropeptide mRNAs production was unchanged.

The anorexigenic peptide PYY₃₋₃₆ is released by intestinal enteroendocrine L-cells in response to eating and acts via NPY-Y2 type receptors. We compared food intake, GFAP labeling in the OB

glomeruli and hypothalamic factor mRNAs in fasted rats (injected with physiological saline) and PYY₃₋₃₆-injected fasted rats, 1 hr after injection. PYY₃₋₃₆ injection significantly reduced (by 17.8%) the average food intake of fasted rats (Figure 3b left). PYY₃₋₃₆ also, like glucose, reversed the astroglial spreading induced by fasting (from $36.9 \pm 2.6\%$ in fasted rats to $26.6 \pm 1.3\%$ in PYY₃₋₃₆-injected fasted rats); the changes were similar in all three OB regions (Figure 3b right). PYY₃₋₃₆ injection did not modify the fasting-induced increase in NPY mRNAs while it reversed that of CRH mRNAs (CRH mRNAs were similar in PYY₃₋₃₆-injected fasting rats and in fed rats) (Table 1, Supporting Information S4), suggesting that, like glucose injection, PYY₃₋₃₆ injection was sufficient to suppress fasting-induced HPA axis activation.

We also studied the influence of leptin, the "satiety" hormone, a potent anorexigenic peptide released by adipose cells, on the food intake and OB glomerular GFAP-labeling of fasted rats (injected with physiological saline) and leptin-injected fasted rats, 1 hr after injection. Leptin injection significantly reduced (by more than 23%) the average food intake of fasted rats (Figure 3c left), but, unlike glucose and PYY₃₋₃₆, did not alter the astroglial spreading induced by fasting in the three OB regions (Figure 3c right).

3.3 | Orexigenic context in vivo: ghrelin does not modify astroglial coverage in fed rats

We explored the influence of ghrelin, the "hunger" hormone, a potent orexigenic peptide released by gastric neuroendocrine cells, by comparing food intake, hypothalamic factor mRNAs production and OB glomerular GFAP-labeling in fed (physiological saline) and ghrelin-injected fed rats, 1 hr after injection. Ghrelin injection stimulated food intake in fed rats (Figure 4 left) and increased NPY and CRH mRNAs to the amounts observed in fasted rats; it also increased MC4R mRNAs coding for the melanocortin 4 receptors on POMC neurons. This may be related to the complex interactions between AGRP-NPY neurons and POMC neurons. Notably, the orexigenic action of ghrelin requires the binding of AGRP on MC4R to inhibit POMC neurons (Shaw, Irani, Moore, Haskell-Luevano, & Millard, 2005) (Table 1, Supporting Information S4). Despite ghrelin injection stimulated orexigenic pathways, it did not change the average glomerular GFAP-area overall the OB regions in ghrelin-injected fed rats ($32.3 \pm 1.2\%$) compared to fed rats ($29.2 \pm 1.2\%$) (Figure 4 right).

3.4 | Orexigenic context ex vivo: Ghrelin and NPY (but not hypoglycemia) increase glomerular astroglial coverage in acute OB slices

Most of the orexigenic and anorexigenic factors tested *in vivo* in fed or fasted rats trigger multiple peripheral and central effects implicated in the complex gut-brain pathways that regulate food intake. We have thus developed an *ex vivo* model of OB slices incubated with ACSF containing peptides (or different glucose concentrations), to differentiate direct from indirect effects of the metabolic factors tested *in vivo*. In control conditions, the average

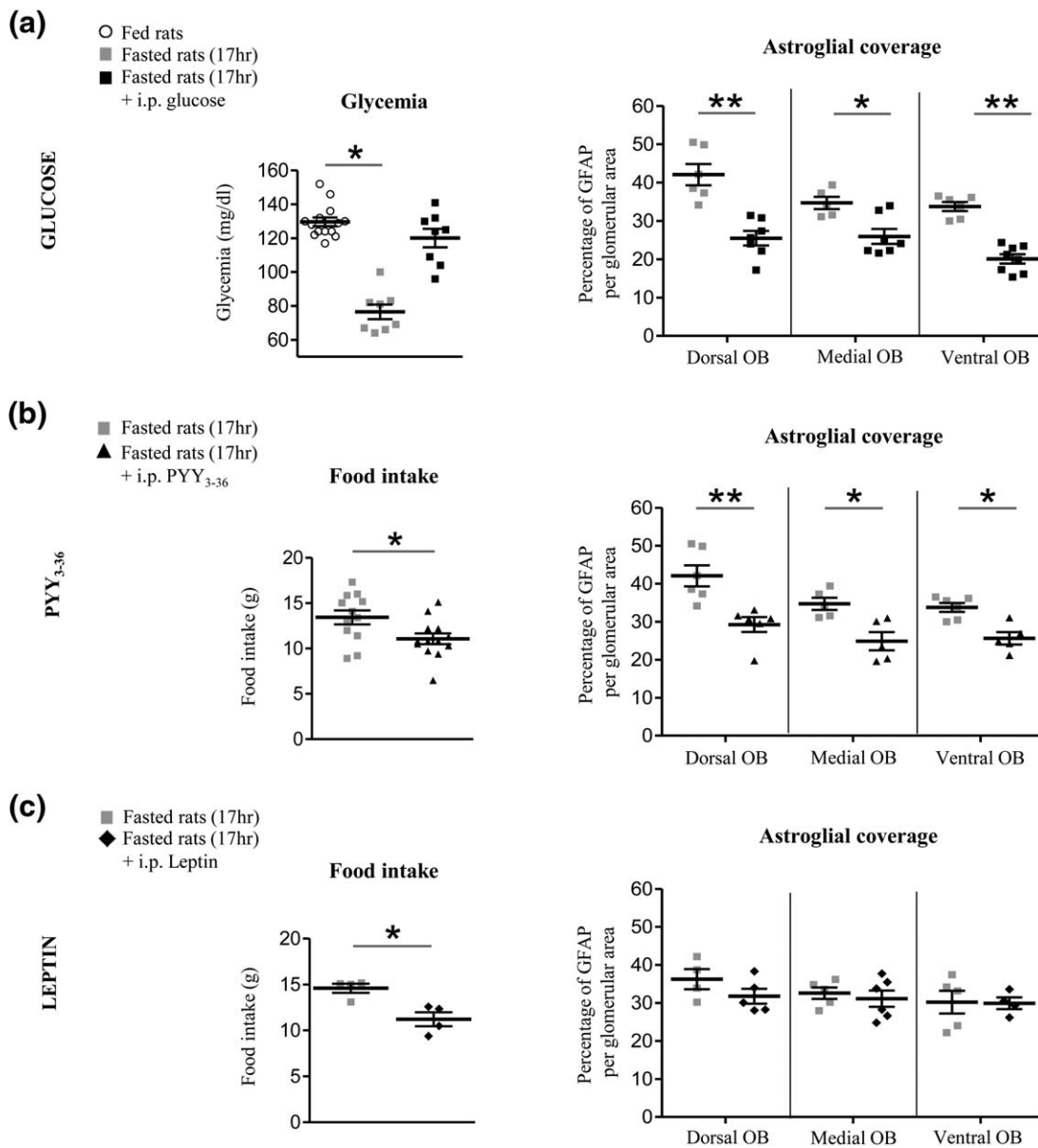


FIGURE 3 Glucose and PYY₃₋₃₆, but not leptin, reverse glomerular astroglial spreading in fasted rats. (a) Effect of glucose injection on fasted rats. *Left panel:* Average glycemia (mg/dL) in fed, fasted, and glucose-injected fasted rats. All rats were injected intraperitoneally, fed rats with normal saline, and fasted rats with normal saline (Fasted rats (17 hr)) or normal saline containing 2 g/kg/ml glucose (Fasted rats (17 hr) + i.p. glucose). Glycemia were measured 1 hr after i.p. injection. Values are means \pm SEM ($n = 8-14$ rats per condition), $p < 0.05$ (*). *Right panel:* glomerular GFAP labeling in the dorsal, medial and ventral regions of the OB of 17 hr-fasted and glucose-injected 17 hr-fasted rats, and expressed as a percentage of the glomerular area (means \pm SEM; 40–60 glomeruli/section, 2–3 sections per OB region for each rat, $n = 5-8$ rats per condition), $p < 0.05$ (*), $p < 0.01$ (**). (b) Effect of PYY₃₋₃₆ injection on fasted rats. *Left panel:* food intake (g/cage/2 rats) of 17 hr-fasted and PYY₃₋₃₆-injected 17 hr-fasted rats, measured over 1 hr following i.p. injection. Fasted rats were injected with normal saline (Fasted rats (17 hr)) or normal saline containing 100 μ g/kg/ml PYY₃₋₃₆ (Fasted rats (17 hr) + i.p. PYY₃₋₃₆). Values are means \pm SEM ($n = 12-13$ cages/24–26 rats per condition), $p < 0.05$ (*). *Right panel:* glomerular GFAP labeling in the dorsal, medial and ventral regions of the OB of 17 hr-fasted and PYY₃₋₃₆-injected 17 hr-fasted rats, as a percentage of the glomerular area (means \pm SEM; 40–60 glomeruli/section, 2–3 sections per OB region of each rat, $n = 5-6$ rats per condition), $p < 0.05$ (*), $p < 0.01$ (**). (c) Effect of Leptin injection in fasted rats. *Left panel:* food intake (g/cage/2 rats) of 17 hr-fasted and leptin-injected 17 hr-fasted rats, measured over 1 hr following i.p. injection. Fasted rats were injected with normal saline (Fasted rats (17 hr)) or normal saline containing 25 μ g/kg/ml leptin (Fasted rats (17 hr) + i.p. Leptin). Values are means \pm SEM ($n = 4$ cages/8 rats per condition), $p < 0.05$ (*). *Right panel:* glomerular GFAP labeling in the dorsal, medial and ventral regions of the OB of 17 hr-fasted and leptin-injected 17 hr-fasted rats, expressed as a percentage of the glomerular area (means \pm SEM; 40–60 glomeruli/section, 2–3 sections per OB region for each rat, $n = 4-6$ rats per condition)

GFAP-labeled area in OB slices was $18.8 \pm 0.7\%$ of the glomerular area ($n = 24$ slices). We mimicked a hypoglycemic episode by incubating OB slices for 1 hr in low-glucose ACSF (5 mM or 2.5 mM

glucose). Neither of these hypoglycemic conditions significantly altered the glomerular astroglial coverage, despite a slight upward tendency (Figure 5a).

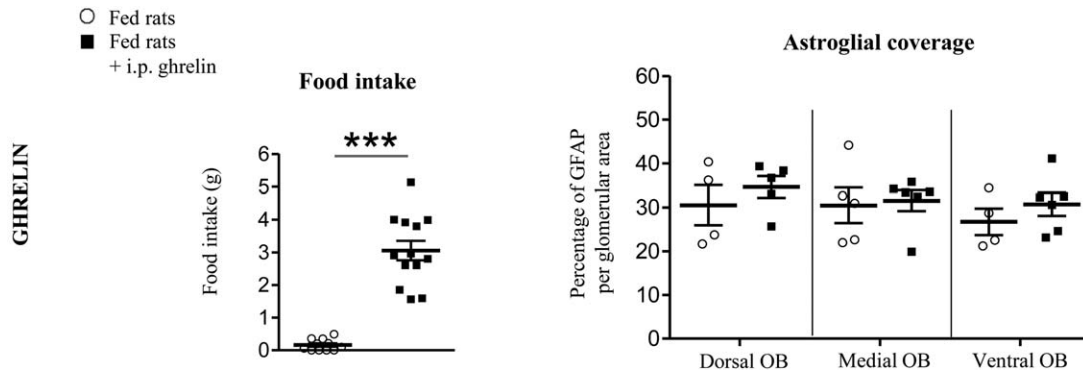


FIGURE 4 Ghrelin does not modify astroglial coverage in fed rats. *Left panel:* food intake (g/cage/2 rats) of fed and ghrelin-injected fed rats, measured over 1 hr following injection. Fed rats were injected with normal saline (Fed rats) or normal saline containing 40 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{ml}$ ghrelin (Fed rats + i.p. ghrelin). Values are means \pm SEM ($n = 11\text{--}13$ cages/22–26 rats per condition), $p < 0.001$ (***). *Right panel:* glomerular GFAP labeling in the dorsal, medial and ventral regions of the OB of fed and ghrelin-injected fed rats, as a percentage of the glomerular area (means \pm SEM; 40–60 glomeruli/section, 2–3 sections per OB region for each rat, $n = 4\text{--}6$ rats per condition)

In contrast, incubating OB slices for 1 hr with an ACSF containing 30 nM ghrelin or the orexigenic neuropeptide NPY (1 μM) increased respectively by 24% and 30% the average GFAP-covered glomerular area (Figure 5b & c).

3.5 | Anorexigenic peptides ex vivo: PYY_{3–36} (but not leptin) decreases glomerular astroglial coverage in acute OB slices

Incubating OB slices with 100 nM PYY_{3–36} (Figure 6a) for 1 hr significantly decreased the GFAP labeling (by more than 18%), whereas incubation with 100 nM leptin did not (Figure 6b).

4 | DISCUSSION

We have demonstrated that the astrocytes morphology in the OB glomeruli is plastic and influenced by the nutritional status of the animal. Fasting increased the density of GFAP-labeled processes in rats OB glomeruli, and this structural change was rapidly reversed by restoring glycemia or by injecting the satietogenic peptide PYY_{3–36}. We have confirmed the involvement of food intake regulatory peptides in this plasticity by showing, in an *ex vivo* model of OB slices, that the orexigenic peptides ghrelin and NPY stimulated astroglial spreading, while the anorexigenic peptide PYY_{3–36} triggered withdrawal of astroglial processes in the glomeruli. However, leptin, which is released upon satiety, did not influence the morphology of the OB astroglial network, either *in vivo* or *ex vivo*.

The morphological change in fasted rats involves an average 40% increase in the area of GFAP-labeling in the OB glomeruli. This is not due to astrocyte proliferation or migration, as we found no change in astrocyte numbers in the glomeruli. This is probably not due either to astrogliosis, as the total amount of GFAP analyzed by western blotting and the appearance of GFAP-labeled processes were unchanged in the fasting rats (astrogliosis is associated to a large increase in GFAP expression, and in process thickness or tortuosity (Pekny, Wilhelmsson, & Pekna, 2014)). Furthermore, astrogliosis is not rapidly reversible,

while the increase in GFAP coverage of the glomeruli was reversed 1 hr after glucose or PYY_{3–36} i.p. injection in 17 hr-fasting rats. Neither is it due to a decrease in the size of the glomeruli; they were similar in all OB regions and rat groups. The increased astroglial spreading might also reflect an attempt by the astrocytes to compensate for the decreased glucose supply in hypoglycemic fasted animals, by reinforcing their neuron coverage for energy supply. Were this so, the increased astroglial spreading should be similar in all OB layers. However, the GFAP density in the external plexiform layer, adjacent to the glomerular layer, is unchanged.

Albeit only present in the main processes, GFAP is the reference marker to compare astroglial morphological changes (Wang & Bordey, 2008), including the characterization of astrogliosis (Pekny et al., 2014), the reversible deployment-retraction of astrocytes main processes in hypothalamic structures (Theodosis et al., 2008), the changes in astrocytes arborization due to increased neuronal activity (Viola et al., 2009), or to senescence (Tynan et al., 2013). The increased area of GFAP-labeling in the OB glomeruli of fasted rats is due to increased reticulation of the astroglial processes network as shown by the “skeleton analysis”. This agrees with the concept of a plastic change in the elongation and/or branching of the astroglial GFAP-containing main processes, shown in the suprachiasmatic nucleus in response to circadian rhythms (Lavialle & Servière, 1995; Lavialle et al., 2001), the supra-optic nucleus in response to dehydration (Bobak & Salm, 1996), the arcuate or the preoptic nuclei in response to changes in steroid sex hormones (Garcia-Segura, Chowen, Duñas, Torres-Aleman, & Naftolin, 1994; Jansen et al., 2003). The increased astroglial coverage induced by fasting is rapidly reversible, being abolished within 1 hr after the restoration of glycemia by an i.p. injection of glucose, or the satietogenic peptide PYY_{3–36}. This timing is very similar to that of other examples of astroglial structural plasticity. Astrocytes change the deployment of their processes within a few hours during the 24-h day-night cycle in the suprachiasmatic nuclei of the Syrian hamster (by 30%, Lavialle et al., 2001), and in the rat supraoptic nuclei in response to parturition or lactation (Theodosis et al., 2008). Changes in astroglial deployment have also been reported 1 or 2 hr after experimental induction, similarly

to our observations in acute OB slices: in the arcuate nuclei of ovariectomized rats given estradiol, and in acute hypothalamic slices in response to neuropeptides (Theodosis et al., 2008).

The changes in the deployment of the GFAP-labeled main processes have been examined by electronic microscopy in some systems. They are accompanied by changes in the thin mobile peripheral astroglial processes (PAP) devoid of GFAP and in the extent of their contact with neuronal and synaptic compartments (Lavialle et al., 2011;

Theodosis et al., 2008). Therefore the increased GFAP density and network reticulation in the OB glomeruli of fasted rats probably contributes to increased astroglial coverage of the neuropil. Changes in the astroglial coverage of the neuronal and synaptic environment have been thoroughly investigated in the supraoptic nuclei where they can induce complex changes in neuronal transmission (Theodosis et al., 2008). Many models have shown that the extent of astrocytes apposition to neuronal surfaces and synaptic clefts determines the possibility of new synapse formation and the astroglial control of synaptic activity (Ben Achour & Pascual, 2010; Bernardinelli et al., 2014; Heller & Rusakov, 2015; Reichenbach et al., 2010). Kozlov, Angulo, Audinat, and Charpak, (2006) demonstrated that astrocytes in the OB release both glutamate and GABA, the former eliciting slow inward currents in granule and mitral cells, and the later generating outward currents which may help synchronize neuronal firing. The distribution of astroglial processes in the glomerulus neuropil was extensively characterized by Chao et al. (1997), who showed that astroglial coverage is restricted to the nonsensory synapses and does not contact sensory synapses directly involving the OSN axons. The nonsensory synapses are those where periglomerular cells and centrifugal projections establish dendrodendritic and axo-dendritic synapses with mitral cells (Matsutani & Yamamoto, 2008). We therefore hypothesize that the increased astroglial coverage in fasting rats mainly concerns these nonsensory synapses.

The fasting-induced increase in astroglial control around these synapses may weaken the local and central modulation of mitral cells, and/or enhance synchronization between mitral cells (Kozlov et al., 2006), which may free and amplify the signal transmission between OSNs and mitral cells. The densification of the astrocyte network in fasted rat glomeruli may therefore increase the mitral cell activity (Apelbaum & Chapat, 2003; Pager et al., 1972) and olfactory sensitivity (Aimé et al., 2007) as seen in fasted rodents, and to a lesser extent in fasted humans (Cameron, Goldfield, & Doucet, 2012; Ramaekers, Verhoef, Gort, Luning, & Boesveldt, 2016). We cannot exclude that the fasting-induced astroglial spreading in glomeruli have also increased the astroglial coverage of sensory synapses; this may also regulate the olfactory sensory input. Whatever the mechanism, the association between astroglial density and a reinforced olfactory signal has been suggested

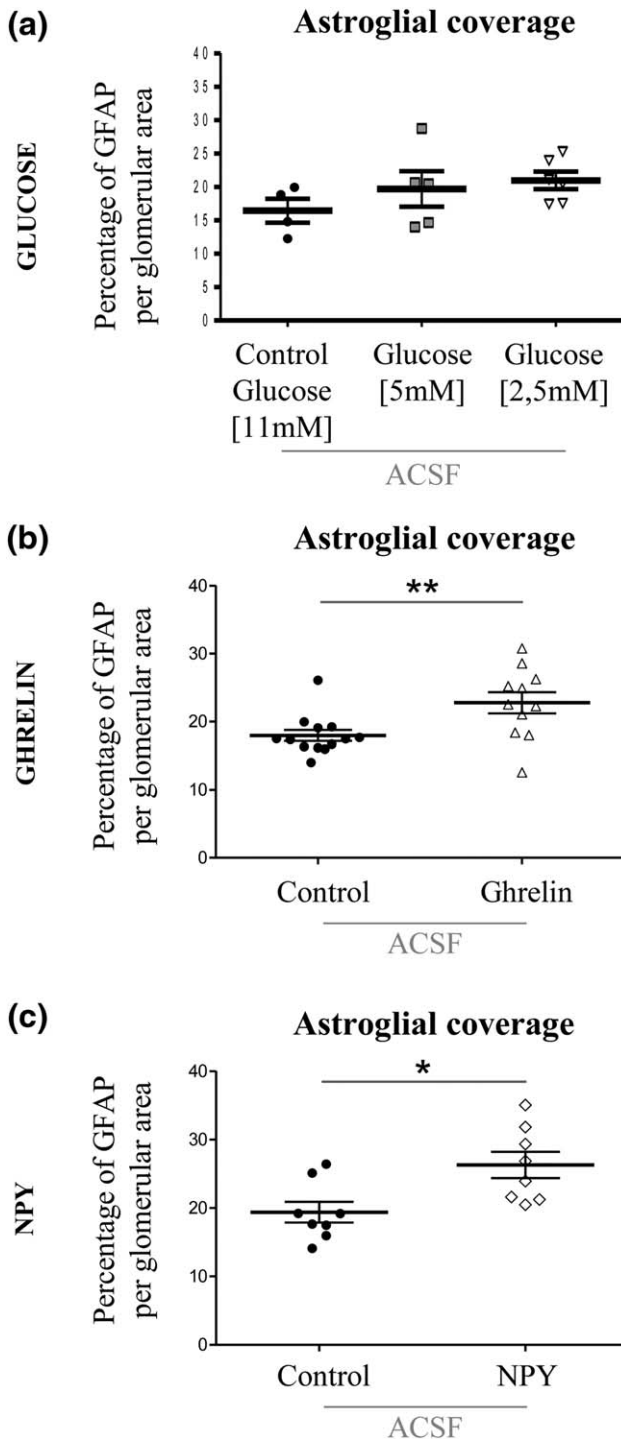


FIGURE 5.

FIGURE 5 Ghrelin and NPY (but not hypoglycemia) increase glomerular astroglial coverage in acute OB slices. (a) Effect of glucose reduction, Glomerular GFAP labeling of OB slices incubated for 1 hr in ACSF containing normal (11 mM) and reduced (5 mM or 2.5 mM) glucose. GFAP area is expressed as a percentage of the glomerular area (means \pm SEM; 3–4 glomeruli/slice, 4–6 slices per condition). (b) Effect of ghrelin treatment, Glomerular GFAP labeling of OB slices incubated for 1 hr in control ACSF or ACSF containing 30 nM ghrelin. GFAP area is expressed as a percentage of the glomerular area (means \pm SEM; 3–4 glomeruli/slice, 11–13 slices per condition), $p < 0.01$ (**). (c) Effect of NPY treatment, Glomerular GFAP labeling of OB slices incubated for 1 hr in control ACSF or ACSF containing 1 μ M NPY. GFAP area is expressed as a percentage of the glomerular area (means \pm SEM; 3–4 glomeruli/slice, 8 slices per condition), $p < 0.05$ (*)

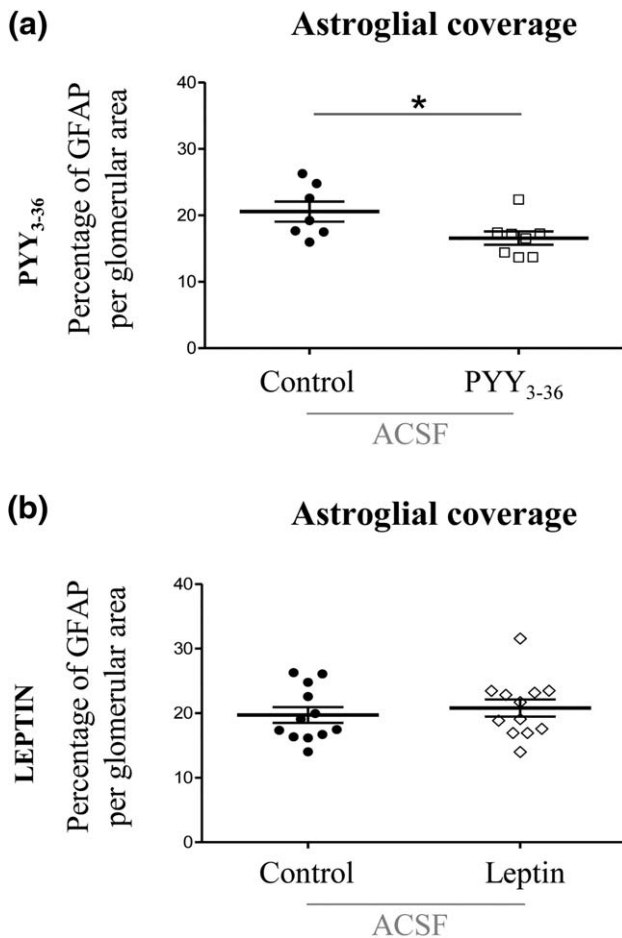


FIGURE 6 PYY₃₋₃₆ (but not leptin) decreases glomerular astroglial coverage in acute OB slices. (a) Effect of PYY₃₋₃₆ treatment, Glomerular GFAP labeling of acute OB slices incubated for 1 hr in control ACSF or ACSF containing 100 nM PYY₃₋₃₆. GFAP area is expressed as a percentage of the glomerular area (means \pm SEM; 3–4 glomeruli/slice, 7–8 slices per condition), $p < 0.05$ (*). (b) Effect of leptin treatment, Glomerular GFAP labeling of acute OB slices incubated for 1 hr in control ACSF or ACSF containing 100 nM leptin. GFAP area is expressed as a percentage of the glomerular area (means \pm SEM; 3–4 glomeruli/slice, 12 slices per condition)

by Matsutani and Leon (1993). They showed a specific increase in the density of GFAP processes in the OB glomeruli responding to a peppermint odor for which rat pups had developed a preference.

The shortest fasting duration we tested, 17 h, induced the greatest glomerular astroglial plasticity, with an average of 44% increased coverage in all regions of the OB (ventral, medial, dorsal). In contrast, spreading was restricted to the OB ventral and medial parts after fasting for 24 h, while fasting for 48 hr induced no astroglial spreading in any OB region. This suggests that astroglial plasticity is part of a process that adapts the olfactory signal to physiological fasting. Prolonged fasting is stressful, and fasting for 24 hr to 48 hr activates the HPA axis and increases blood corticosterone in rats, depending on strain and age (Dietze, Lees, Fink, Brosda, & Voigt, 2016; Rowland, 2007). Our 48 hr-fasted rats lost 18% of their body weight, probably associated with activation of the HPA axis. This may counteract glomerular astroglial

spreading, since we and others have shown that corticosterone induces retraction of the astrocyte processes in vitro (Champeil-Potokar et al., 2015) and in vivo (Tynan et al., 2013).

A glucose i.p. injection that restored the glycemia of fasted rats to normal also reversed the fasting-induced increase in glomerular astrocytes spreading within 1 h. Restoring blood glucose therefore appears to be a sufficient signal for astrocytes to retract their processes. Although astrocytes are regarded as glucose sensors in the arcuate hypothalamic nuclei (Leloup et al., 2016), astrocytes in OB slices do not undergo any morphological changes in response to variations in glucose concentration. Therefore, the astroglial retracting-effect of increasing the blood glucose of fasted rats by glucose injection is probably indirect. It could be mediated by any of the hormonal changes that accompany the restoration of glycemia. PYY₃₋₃₆, an active anorexigenic peptide released into the blood by the digestive tract after a meal, is probably one of them, since it also reversed astroglial spreading in fasted rats 1 hr after its injection. Restoring glycemia may trigger the rapid release of PYY₃₋₃₆ even without any food intake, through basolateral stimulation of the intestinal cells by hypothalamic peptides (Panaro et al., 2014). PYY₃₋₃₆ also causes the astroglial processes in the glomeruli of acute OB slices to retract, suggesting a direct action. There are Y2R receptors in the astrocytes and periglomerular neurons (data not shown). The involvement of PYY in the olfactory physiology had not been studied before, except by Doyle, Hort, Herzog, and Shine, (2012), who used PYY knockout mice to show that PYY takes part in the regulation of olfactory neuron differentiation. Our results suggest that PYY₃₋₃₆ is involved in the adaptation of the olfactory system to the fed-fasted state.

In contrast, leptin, the main anorexigenic hormone released by adipose tissue, did not trigger the retraction of astrocytes in the glomeruli of fasted rats or of acute OB slices. Thus, leptin, whose concentration varies greatly with the fed or fasted state, is probably not involved in the glomerular astroglial plasticity. This is unexpected since several studies showing a decreased olfactory sensitivity, food odor exploratory behavior, and c-fos activation of OB neurons in fasting rats injected with leptin indicate that leptin is involved in adapting the olfactory system to the fed-fasted state (Julliard et al., 2007; Prud'homme et al., 2009). The lack of effect of leptin in OB glomerular astrocytes also contrasts with the work of García-Cáceres et al., (2011), who showed that leptin induced changes in astrocyte morphology in the rat hypothalamic arcuate nuclei. The effect of leptin may thus be specific to astrocytes of the arcuate nuclei. Besides, leptin may be more involved in the long-term regulation of energy balance than in hunger-satiety perception.

Ghrelin, the main orexigenic hormone released by gastric and duodenal cells in hungry animals and humans anticipating a meal (Williams & Elmquist, 2012), enhances the olfactory capacity, or responses, in both humans (Sun, Veldhuizen, Babbs, Sinha, & Small, 2016; Tong et al., 2011; Trellakis et al., 2011) and rodents (Loch et al., 2015; Tong et al., 2011). Although i.p. ghrelin rapidly increased food intake in fed rats, it did not change OB glomerular astroglial spreading. However, incubation of OB slices with ghrelin increased glomerular astroglial coverage by 24%, suggesting that ghrelin has a direct impact on astroglial



plasticity. A few studies have shown that astrocytes possess ghrelin receptors and respond to ghrelin in several of their functions including glucose sensing, neurotransmitter regulation and motility (Frago & Chwen, 2017). The lack of any effect of ghrelin *in vivo*, in contrast to its *ex vivo* stimulation of glomerular astrocytes spreading, may be due to at least two factors. First, ghrelin may be inefficient in fed animals with a high blood concentration of anorexigenic peptides. Second, acyl-ghrelin (the active form used in our study) is also rapidly catabolized by carboxylesterase in the blood, with a half-life of 30 minutes in rodents (Xu et al., 2014). Therefore, the putative action of ghrelin on the glomerular astrocytes of our fed rats may have been too fast and transient to be observed 1 hr after the injections.

The fasting-induced spreading of glomerular astrocytes may also be due to the action of the orexigenic peptide NPY, which triggered a 25% increase in astroglial coverage in OB acute slices. One of the major effects of ghrelin in fasting animals is to stimulate NPY release by the arcuate nucleus orexigenic neurons (Abizaid, Gao, & Horvath, 2006), as we have confirmed by showing an increased NPY mRNA in the hypothalamus of fasting rats and in ghrelin-injected fed rats. NPY is particularly abundant in the OB, where it is mainly associated with centrifugal fibers coming from the locus coeruleus (Bouna, Gysling, Calas, & Araneda, 1994) and possibly from the hypothalamus (Wirsig-Wiechmann, Wiechmann, & Eisthen, 2002), and, to a lesser extent, with periglomerular neurons and ensheathing cells (Jia & Hegg, 2010). Although there is no clear published evidence, ghrelin-stimulated hypothalamic orexigenic fibers probably enhance the release of NPY in the OB of fasted rats. NPY is also present in the olfactory mucosa, where it enhances the odor-induced stimulation of OSN (Doyle et al., 2008; Negroni et al., 2012). Therefore NPY, whose Y1R receptors have been found in several OB regions (Dumont, Fournier, St-Pierre, & Quirion, 1996; Kopp et al., 2002), could be an effector of the glomerular astroglial plasticity occurring in response to fasting.

In conclusion, we have characterized a marked, reversible increase in astroglial coverage in rat OB glomeruli in response to fasting, demonstrating the morphological plasticity of OB glomerular astrocytes and its association with the nutritional status of rats. This plasticity occurs in response to physiological fasting but not to prolonged stressful fasting, and may be involved in the physiological adaptation of olfaction to metabolic state, supporting part of the hedonic regulation of food-intake. As glomerular astrocytes are mostly associated with modulatory nonsensory synapses, fasting-induced astroglial spreading may release the olfactory signal from the complex regulations associated with memory, emotion, and consciousness. The resulting amplified olfactory signal would favor food seeking and willingness to eat, as shown in many fasting situations (Aimé et al., 2007; Cameron et al., 2012; Prud'homme et al., 2009).

We have also identified several major regulators of food intake (PYY₃₋₃₆, ghrelin and NPY) as effective drivers of these astroglial changes. The influence of other food-intake regulatory peptides that target the OB, such as cholecystokinin (CCK) and adiponectin, should also be investigated. Astroglial plasticity may also result from fasting-induced changes in neuronal signals such as the release of

neurotransmitters from periglomerular cells (GABA, dopamine) and centrifugal projections (glutamate, serotonin, acetylcholine) (Matsutani & Yamamoto, 2008; Gómez et al., 2005), for which astrocytes have specific receptors (Verkhatsky, 2009).

Our study highlights a new implication of the morphological plasticity of astrocytes in an adaptive neurophysiological process, within the context of a sensory system. The plasticity we evidenced is also a marker of the metabolic modulation of olfaction. It thereby provides a useful experimental tool to explore the changes in the sensory regulation of food intake that are thought to occur during stress, aging, unbalanced diets, and other disorders leading to malnutrition or obesity.

ACKNOWLEDGMENT

This work was funded by the Institut National de la Recherche Agronomique (INRA). Support for this work was provided by a PhD fellowship co-financed by Phase (Animal Physiology and Livestock Systems) and AlimH (Human Nutrition) research divisions of INRA (to V. D.-M.). The authors thank Sacha MUSZLAK for his help with images analysis. The English text was edited by Dr Owen PARKES.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

ID and PC supervised the project. VDM, ID and PC designed the study. VDM was the principal investigator who performed the experiments and analyzed the data. GCP, ID and PC contributed to the experiments and to data analysis. CC designed and supervised the qRT-PCR experiments. CP and PD gave substantial technical support and took part in data collection. VDM, GCP, ID and PC wrote the manuscript. All the authors discussed the results and implications, and commented on the manuscript at different stages. The authors have no conflict of interest to declare.

ORCID

Patrice Congar  <http://orcid.org/0000-0002-5691-6582>

Isabelle Denis  <http://orcid.org/0000-0003-0170-2963>

REFERENCES

- Abizaid, A., Gao, Q., & Horvath, T. L. (2006). Thoughts for food: brain mechanisms and peripheral energy balance. *Neuron*, *51*(6), 691–702. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2006.08.025>
- Abraham, N. M., Vincis, R., Lagier, S., Rodriguez, I., & Carleton, A. (2014). Long term functional plasticity of sensory inputs mediated by olfactory learning. *eLife*, *3*, <https://doi.org/10.7554/eLife.02109>
- Aimé, P., Duchamp-Viret, P., Chaput, M. A., Savigner, A., Mahfouz, M., & Julliard, A. K. (2007). Fasting increases and satiation decreases olfactory detection for a neutral odor in rats. *Behavioural Brain Research*, *179*(2), 258–264. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2007.02.012>
- Aimé, P., Hegoburu, C., Jaillard, T., Degletagne, C., Garcia, S., Messaoudi, B., ... Julliard, A. K. (2012). 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*(12), e51227. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0051227>

- Apelbaum, A. F., & Chaput, M. A. (2003). Rats habituated to chronic feeding restriction show a smaller increase in olfactory bulb reactivity compared to newly fasted rats. *Chemical Senses*, 28(5), 389–395.
- Arganda-Carreras, I., Fernández-González, R., Muñoz-Barrutia, A., & Ortiz-De-Solorzano, C. (2010). 3D reconstruction of histological sections: Application to mammary gland tissue. *Microscopy Research and Technique*, 73(11), 1019–1029. <https://doi.org/10.1002/jemt.20829>
- Bailey, M. S., & Shipley, M. T. (1993). Astrocyte subtypes in the rat olfactory bulb: morphological heterogeneity and differential laminar distribution. *The Journal of Comparative Neurology*, 328(4), 501–526. <https://doi.org/10.1002/cne.903280405>
- Becquet, D., Girardet, C., Guillaumond, F., François-Bellan, A.-M., & Bosler, O. (2008). Ultrastructural plasticity in the rat suprachiasmatic nucleus. Possible involvement in clock entrainment. *Glia*, 56(3), 294–305. <https://doi.org/10.1002/glia.20613>
- Ben Achour, S., & Pascual, O. (2010). Glia: the many ways to modulate synaptic plasticity. *Neurochemistry International*, 57(4), 440–445. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2010.02.013>
- Bernardinelli, Y., Randall, J., Janett, E., Nikonenko, I., König, S., Jones, E. V., ... Muller, D. (2014). Activity-dependent structural plasticity of perisynaptic astrocytic domains promotes excitatory synapse stability. *Current Biology: CB*, 24(15), 1679–1688. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2014.06.025>
- Bobak, J. B., & Salm, A. K. (1996). Plasticity of astrocytes of the ventral glial limitans subjacent to the supraoptic nucleus. *The Journal of Comparative Neurology*, 376(2), 188–197. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-9861\(19961209\)376:2andlt;188::AID-CNE2andlt;3.0.CO;2-#](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9861(19961209)376:2andlt;188::AID-CNE2andlt;3.0.CO;2-#)
- Bouna, S., Gysling, K., Calas, A., & Araneda, S. (1994). Some noradrenergic neurons of locus ceruleus-olfactory pathways contain neuropeptide-Y. *Brain Research Bulletin*, 34(4), 413–417.
- Cameron, J. D., Goldfield, G. S., & Doucet, É. (2012). Fasting for 24 h improves nasal chemosensory performance and food palatability in a related manner. *Appetite*, 58(3), 978–981. <https://doi.org/10.1016/j.appet.2012.02.050>
- Champeil-Potokar, G., Hennebelle, M., Latour, A., Vancassel, S., & Denis, I. (2015). Docosahexaenoic acid (DHA) prevents corticosterone-induced changes in astrocyte morphology and function. *Journal of Neurochemistry*, <https://doi.org/10.1111/jnc.13510>
- Chao, T. I., Kasa, P., & Wolff, J. R. (1997). Distribution of astroglia in glomeruli of the rat main olfactory bulb: exclusion from the sensory sub-compartment of neuropil. *Journal of Comparative Neurology*, 388(2), 191–210.
- Chaput, M., & Holley, A. (1976). Olfactory bulb responsiveness to food odour during stomach distension in the rat. *Chemical Senses*, 2(2), 189–201. <https://doi.org/10.1093/chemse/2.2.189>
- Detje, C. N., Lienenklaus, S., Chhatbar, C., Spanier, J., Prajeeth, C. K., Soldner, C., ... Kalinke, U. (2015). Upon intranasal vesicular stomatitis virus infection, astrocytes in the olfactory bulb are important interferon Beta producers that protect from lethal encephalitis. *Journal of Virology*, 89(5), 2731–2738. <https://doi.org/10.1128/JVI.02044-14>
- Dietze, S., Lees, K. R., Fink, H., Brosda, J., & Voigt, J.-P. (2016). Food Deprivation, Body Weight Loss and Anxiety-Related Behavior in Rats. *Animals: An Open Access Journal from MDPI*, 6(1), <https://doi.org/10.3390/ani6010004>
- Doengi, M., Deitmer, J. W., & Lohr, C. (2008). New evidence for purinergic signaling in the olfactory bulb: A2A and P2Y1 receptors mediate intracellular calcium release in astrocytes. *FASEB Journal*, 22(7), 2368–2378. <https://doi.org/10.1096/fj.07-101782>
- Doyle, K. L., Karl, T., Hort, Y., Duffy, L., Shine, J., & Herzog, H. (2008). Y1 receptors are critical for the proliferation of adult mouse precursor cells in the olfactory neuroepithelium. *Journal of Neurochemistry*, 105(3), 641–652. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2007.05188.x>
- Doyle, K. L., Hort, Y. J., Herzog, H., & Shine, J. (2012). Neuropeptide Y and peptide YY have distinct roles in adult mouse olfactory neurogenesis. *Journal of Neuroscience Research*, 90(6), 1126–1135. <https://doi.org/10.1002/jnr.23008>
- Droste, D., Seifert, G., Seddar, L., Jädtke, O., Steinhäuser, C., & Lohr, C. (2017). Ca(2+)-permeable AMPA receptors in mouse olfactory bulb astrocytes. *Scientific Reports*, 7, 44817. <https://doi.org/10.1038/srep44817>
- Duclaux, R., Feisthauer, J., & Cabanac, M. (1973). Effects of a meal on the pleasantness of food and nonfood odors in man. *Physiology and Behavior*, 10(6), 1029–1033.
- Dumont, Y., Fournier, A., St-Pierre, S., & Quirion, R. (1996). Autoradiographic distribution of [125I]Leu31,Pro34]PYY and [125I]PYY3–36 binding sites in the rat brain evaluated with two newly developed Y1 and Y2 receptor radioligands. *Synapse (New York, N.Y.)*, 22(2), 139–158. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-2396\(199602\)22:2andlt;139::AID-SYN7andlt;3.0.CO;2-E](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-2396(199602)22:2andlt;139::AID-SYN7andlt;3.0.CO;2-E)
- Frago, L. M., & Chowen, J. A. (2017). Involvement of Astrocytes in Mediating the Central Effects of Ghrelin. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(3), <https://doi.org/10.3390/ijms18030536>
- García-Cáceres, C., Fuente-Martín, E., Burgos-Ramos, E., Granado, M., Frago, L. M., Barrios, V., ... Chowen, J. A. (2011). Differential acute and chronic effects of leptin on hypothalamic astrocyte morphology and synaptic protein levels. *Endocrinology*, 152(5), 1809–1818. <https://doi.org/10.1210/en.2010-1252>
- García-Segura, L. M., Chowen, J. A., Dueñas, M., Torres-Aleman, I., & Naftolin, F. (1994). Gonadal steroids as promoters of neuro-glial plasticity. *Psychoneuroendocrinology*, 19(5–7), 445–453.
- Gengatharan, A., Bammann, R. R., & Saghatelyan, A. (2016). The Role of Astrocytes in the Generation, Migration, and Integration of New Neurons in the Adult Olfactory Bulb. *Frontiers in Neuroscience*, 10, 149. <https://doi.org/10.3389/fnins.2016.00149>
- Gerhold, L. M., & Wise, P. M. (2006). Vasoactive intestinal polypeptide regulates dynamic changes in astrocyte morphometry: impact on gonadotropin-releasing hormone neurons. *Endocrinology*, 147(5), 2197–2202. <https://doi.org/10.1210/en.2005-1262>
- Gómez, C., Briñón, J. G., Barbado, M. V., Weruaga, E., Valero, J., & Alonso, J. R. (2005). Heterogeneous targeting of centrifugal inputs to the glomerular layer of the main olfactory bulb. *Journal of Chemical Neuroanatomy*, 29(4), 238–254. <https://doi.org/10.1016/j.jchemneu.2005.01.005>
- Heller, J. P., & Rusakov, D. A. (2015). Morphological plasticity of astroglia: Understanding synaptic microenvironment: Morphological Plasticity of Astroglia. *Glia*, 63(12), 2133–2151. <https://doi.org/10.1002/glia.22821>
- Jansen, A., Theunissen, N., Slechten, K., Nederkoorn, C., Boon, B., Mulkens, S., & Roefs, A. (2003). Overweight children overeat after exposure to food cues. *Eating Behaviors*, 4(2), 197–209. [https://doi.org/10.1016/S1471-0153\(03\)00011-4](https://doi.org/10.1016/S1471-0153(03)00011-4)
- Jia, C., & Hegg, C. C. (2010). NPY mediates ATP-induced neuroproliferation in adult mouse olfactory epithelium. *Neurobiology of Disease*, 38(3), 405–413. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2010.02.013>
- Jones, O. D. (2015). Astrocyte-mediated metaplasticity in the hippocampus: Help or hindrance?. *Neuroscience*, 309, 113–124. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2015.08.035>
- Julliard, A. K., Chaput, M. A., Apelbaum, A., Aimé, P., Mahfouz, M., & Duchamp-Viret, P. (2007). Changes in rat olfactory detection performance induced by orexin and leptin mimicking fasting and



- sation. *Behavioural Brain Research*, 183(2), 123–129. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2007.05.033>
- Kopp, J., Xu, Z.-Q., Zhang, X., Pedrazzini, T., Herzog, H., Kresse, A., ... Hökfelt, T. (2002). Expression of the neuropeptide Y Y1 receptor in the CNS of rat and of wild-type and Y1 receptor knock-out mice. Focus on immunohistochemical localization. *Neuroscience*, 111(3), 443–532.
- Kozlov, A. S., Angulo, M. C., Audinat, E., & Charpak, S. (2006). Target cell-specific modulation of neuronal activity by astrocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(26), 10058–10063. <https://doi.org/10.1073/pnas.0603741103>
- Lavialle, M., Aumann, G., Anlauf, E., Pröls, F., Arpin, M., & Derouiche, A. (2011). Structural plasticity of perisynaptic astrocyte processes involves ezrin and metabotropic glutamate receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(31), 12915–12919. <https://doi.org/10.1073/pnas.1100957108>
- Lavialle, M., Begue, A., Papiillon, C., & Vilaplana, J. (2001). Modifications of retinal afferent activity induce changes in astroglial plasticity in the hamster circadian clock. *Glia*, 34(2), 88–100. <https://doi.org/10.1002/glia.1044>
- Lavialle, M., & Servière, J. (1995). Developmental study in the circadian clock of the golden hamster: a putative role of astrocytes. *Brain Research. Developmental Brain Research*, 86(1–2), 275–282.
- Leloup, C., Allard, C., Carneiro, L., Fioramonti, X., Collins, S., & Pénicaud, L. (2016). Glucose and hypothalamic astrocytes: More than a fueling role?. *Neuroscience*, 323, 110–120. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2015.06.007>
- Loch, D., Breer, H., & Strotmann, J. (2015). Endocrine Modulation of Olfactory Responsiveness: Effects of the Orexigenic Hormone Ghrelin. *Chemical Senses*, 40(7), 469–479. <https://doi.org/10.1093/chemse/bjv028>
- Loch, D., Heidel, C., Breer, H., & Strotmann, J. (2013). Adiponectin enhances the responsiveness of the olfactory system. *PLoS One*, 8(10), e75716. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0075716>
- Majzoub, J. A. (2006). Corticotropin-releasing hormone physiology. *European Journal of Endocrinology*, 155(suppl 1), S71–S76. <https://doi.org/10.1530/eje.1.02247>
- Martin, C., Houitte, D., Guillemier, M., Petit, F., Bonvento, G., & Gurden, H. (2012). Alteration of sensory-evoked metabolic and oscillatory activities in the olfactory bulb of GLAST-deficient mice. *Frontiers in Neural Circuits*, 6, 1. <https://doi.org/10.3389/fncir.2012.00001>
- Matsutani, S., & Leon, M. (1993). Elaboration of glial cell processes in the rat olfactory bulb associated with early learning. *Brain Research*, 613(2), 317–320.
- Matsutani, S., & Yamamoto, N. (2008). Centrifugal innervation of the mammalian olfactory bulb. *Anatomical Science International*, 83(4), 218–227. <https://doi.org/10.1111/j.1447-073X.2007.00223.x>
- Matyash, V., & Kettenmann, H. (2010). Heterogeneity in astrocyte morphology and physiology. *Brain Research Reviews*, 63(1–2), 2–10. <https://doi.org/10.1016/j.brainresrev.2009.12.001>
- Mori, K., & Sakano, H. (2011). How is the olfactory map formed and interpreted in the mammalian brain?. *Annual Review of Neuroscience*, 34, 467–499. <https://doi.org/10.1146/annurev-neuro-112210-112917>
- Negrone, J., Meunier, N., Monnerie, R., Salesse, R., Baly, C., Caillol, M., & Congar, P. (2012). Neuropeptide Y enhances olfactory mucosa responses to odorant in hungry rats. *PLoS One*, 7(9), e45266. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0045266>
- Otsu, Y., Couchman, K., Lyons, D. G., Collot, M., Agarwal, A., Mallet, J.-M., ... Charpak, S. (2015). Calcium dynamics in astrocyte processes during neurovascular coupling. *Nature Neuroscience*, 18(2), 210–218. <https://doi.org/10.1038/nn.3906>
- Pager, J., Giachetti, I., Holley, A., & Le Magnen, J. (1972). A selective control of olfactory bulb electrical activity in relation to food deprivation and satiety in rats. *Physiology and Behavior*, 9(4), 573–579.
- Palouzier-Paulignan, B., Lacroix, M.-C., Aimé, P., Baly, C., Caillol, M., Congar, P., ... Fadool, D. A. (2012). Olfaction under metabolic influences. *Chemical Senses*, 37(9), 769–797. <https://doi.org/10.1093/chemse/bjs059>
- Panaro, B. L., Tough, I. R., Engelstoft, M. S., Matthews, R. T., Digby, G. J., Møller, C. L., ... Cone, R. D. (2014). The melanocortin-4 receptor is expressed in enteroendocrine L cells and regulates the release of peptide YY and glucagon-like peptide 1 in vivo. *Cell Metabolism*, 20(6), 1018–1029. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2014.10.004>
- Papouin, T., Dunphy, J., Tolman, M., Foley, J. C., & Haydon, P. G. (2017). Astrocytic control of synaptic function. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 372(1715), 20160154. <https://doi.org/10.1098/rstb.2016.0154>
- Pekny, M., Wilhelmsson, U., & Pekna, M. (2014). The dual role of astrocyte activation and reactive gliosis. *Neuroscience Letters*, 565, 30–38. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2013.12.071>
- Petzold, G. C., Albeanu, D. F., Sato, T. F., & Murthy, V. N. (2008). Coupling of neural activity to blood flow in olfactory glomeruli is mediated by astrocytic pathways. *Neuron*, 58(6), 897–910. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2008.04.029>
- Prud'homme, M. J., Lacroix, M. C., Badonnel, K., Gougis, S., Baly, C., Salesse, R., & Caillol, M. (2009). Nutritional status modulates behavioural and olfactory bulb Fos responses to isoamyl acetate or food odour in rats: roles of orexins and leptin. *Neuroscience*, 162(4), 1287–1298. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2009.05.043>
- Ramaekers, M. G., Verhoef, A., Gort, G., Luning, P. A., & Boesveldt, S. (2016). Metabolic and Sensory Influences on Odor Sensitivity in Humans. *Chemical Senses*, 41(2), 163–168. <https://doi.org/10.1093/chemse/bjv068>
- Reichenbach, A., Derouiche, A., & Kirchhoff, F. (2010). Morphology and dynamics of perisynaptic glia. *Brain Research Reviews*, 63(1–2), 11–25. <https://doi.org/10.1016/j.brainresrev.2010.02.003>
- Roux, L., Madar, A., Lacroix, M. M., Yi, C., Benchenane, K., & Giaume, C. (2015). Astroglial connexin 43 hemichannels modulate olfactory bulb slow oscillations. *The Journal of Neuroscience*, 35(46), 15339–15352. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0861-15.2015>
- Rowland, N. E. (2007). Food or fluid restriction in common laboratory animals: balancing welfare considerations with scientific inquiry. *Comparative Medicine*, 57(2), 149–160.
- Schwartz, M. W., Woods, S. C., Porte, D., Seeley, R. J., & Baskin, D. G. (2000). Central nervous system control of food intake. *Nature*, 404(6778), 661–671. <https://doi.org/10.1038/35007534>
- Shaw, A. M., Irani, B. G., Moore, M. C., Haskell-Luevano, C., & Millard, W. J. (2005). Ghrelin-induced food intake and growth hormone secretion are altered in melanocortin 3 and 4 receptor knockout mice. *Peptides*, 26(10), 1720–1727. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2004.12.026>
- Sun, X., Veldhuizen, M. G., Babbs, A. E., Sinha, R., & Small, D. M. (2016). Perceptual and Brain Response to Odors Is Associated with Body Mass Index and Postprandial Total Ghrelin Reactivity to a Meal. *Chemical Senses*, 41(3), 233–248. <https://doi.org/10.1093/chemse/bjv081>
- Theodosis, D. T., Poulain, D. A., & Oliet, S. H. R. (2008). Activity-dependent structural and functional plasticity of astrocyte-neuron interactions. *Physiological Reviews*, 88(3), 983–1008. <https://doi.org/10.1152/physrev.00036.2007>



- Theofilas, P., Steinhäuser, C., Theis, M., & Derouiche, A. (2017). Morphological study of a connexin 43-GFP reporter mouse highlights glial heterogeneity, amacrine cells, and olfactory ensheathing cells: Cx43 Reporter Mouse. *Journal of Neuroscience Research*, *https://doi.org/10.1002/jnr.24055*
- Tong, J., Mannea, E., Aimé, P., Pfluger, P. T., Yi, C.-X., Castaneda, T. R., ... Tschöp, M. H. (2011). Ghrelin enhances olfactory sensitivity and exploratory sniffing in rodents and humans. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *31*(15), 5841–5846. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5680-10.2011>
- Trellakis, S., Tagay, S., Fischer, C., Rydleuskaya, A., Scherag, A., Bruderek, K., ... Brandau, S. (2011). Ghrelin, leptin and adiponectin as possible predictors of the hedonic value of odors. *Regulatory Peptides*, *167*(1), 112–117. <https://doi.org/10.1016/j.regpep.2010.12.005>
- Tynan, R. J., Beynon, S. B., Hinwood, M., Johnson, S. J., Nilsson, M., Woods, J. J., & Walker, F. R. (2013). Chronic stress-induced disruption of the astrocyte network is driven by structural atrophy and not loss of astrocytes. *Acta Neuropathologica*, *126*(1), 75–91. <https://doi.org/10.1007/s00401-013-1102-0>
- Verkhatsky, A. (2009). Neurotransmitter Receptors in Astrocytes. In P. G. Haydon and V. Pappas (Eds.), *Astrocytes in (Patho)Physiology of the Nervous System*. (pp. 49–67). Boston, MA: Springer US. https://doi.org/10.1007/978-0-387-79492-1_3
- Viola, G. G., Rodrigues, L., Américo, J. C., Hansel, G., Vargas, R. S., Biasibetti, R., ... Amaral, O. B. (2009). Morphological changes in hippocampal astrocytes induced by environmental enrichment in mice. *Brain Research*, *1274*, 47–54. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2009.04.007>
- Wang, D., & Bordey, A. (2008). The astrocyte odyssey. *Progress in Neurobiology*, <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2008.09.015>
- Williams, K. W., & Elmquist, J. K. (2012). From neuroanatomy to behavior: central integration of peripheral signals regulating feeding behavior. *Nature Neuroscience*, *15*(10), 1350–1355. <https://doi.org/10.1038/nn.3217>
- Wirsig-Wiechmann, C. R., Wiechmann, A. F., & Eisthen, H. L. (2002). What defines the nervus terminalis? Neurochemical, developmental, and anatomical criteria. *Progress in Brain Research*, *141*, 45–58. [https://doi.org/10.1016/S0079-6123\(02\)41083-7](https://doi.org/10.1016/S0079-6123(02)41083-7)
- Xu, J., Li, Y., Chen, W.-D., Xu, Y., Yin, L., Ge, X., ... Zhang, Y. (2014). Hepatic carboxylesterase 1 is essential for both normal and farnesoid X receptor-controlled lipid homeostasis. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, *59*(5), 1761–1771. <https://doi.org/10.1002/hep.26714>

SUPPORTING INFORMATION

Additional Supporting Information may be found online in the supporting information tab for this article.

How to cite this article: Daumas-Meyer V, Champeil-Potokar G, Chaumontet C, et al. Fasting induces astroglial plasticity in the olfactory bulb glomeruli of rats. *Glia*. 2017;00:1–15. <https://doi.org/10.1002/glia.23280>

Titre : Plasticité morphologique des astrocytes glomérulaires du bulbe olfactif chez le rat : rôle dans la relation entre l'olfaction et la prise alimentaire

Mots clés : Neurophysiologie, Nutrition, Astrocytes, Bulbe olfactif, Olfaction, Prise alimentaire

Résumé : L'olfaction participe à l'élaboration de la valeur hédonique des aliments et à la régulation de la prise alimentaire. Réciproquement, la détection des odeurs alimentaires est influencée par le statut métabolique. Le jeûne augmente les performances olfactives, notamment en augmentant l'activité neuronale dans le bulbe olfactif (BO). Au sein des glomérules du BO, les synapses glutamatergiques entre les neurones sensoriels olfactifs et les cellules mitrales sont régulées par des astrocytes, des neurones périglomérulaires et des afférences centrifuges. En tant que partenaires synaptiques, les astrocytes sont à l'origine de mécanismes de métabolisme dans le système nerveux central, qui pourrait participer à la régulation métabolique de la réponse olfactive au niveau du BO. Afin de tester si les astrocytes glomérulaires du BO sont impliqués dans la détection du statut métabolique par le système olfactif, nous avons comparé le déploiement des prolongements astrocytaires glomérulaires, par quantification de l'aire occupée par la GFAP chez des rats nourris et mis à jeun.

Le déploiement astrocytaire est nettement augmenté chez les rats à jeun par rapport aux rats nourris, dans toutes les régions du BO dès 17h de jeûne. L'administration intra-péritoneale du peptide anorexigène PYY3-36 ou de glucose chez des rats à jeun diminue leur prise alimentaire ou restaure leur glycémie respectivement, et abolit dans les deux cas l'augmentation du déploiement astrocytaire induite par le jeûne. L'application directe des peptides orexigènes ghréline et NPY sur des tranches de BO entraîne une augmentation du déploiement astrocytaire alors que l'application de PYY3-36 entraîne une rétraction astrocytaire au sein des glomérules. Ces résultats concordent avec les variations de la morphologie des astrocytes, observées respectivement en situation de jeûne ou de satiété.

Le déploiement des prolongements astrocytaires glomérulaires varie donc en fonction de l'état métabolique des rats, et il est influencé par les peptides régulant la prise alimentaire. Cette plasticité pourrait participer à l'adaptation de la sensibilité olfactive à l'état métabolique des individus.

Title : Morphological plasticity of the glomerular astrocytes of the olfactory bulb in rats : role in the relationship between olfaction and food intake

Keywords : Neurophysiology, Nutrition, Astrocytes, Olfactory bulb, Olfaction, Food intake

Abstract: Olfaction plays a key role in the elaboration of the hedonic value of foods and the regulation of food intake. Reciprocally, the detection of food odors is influenced by the metabolic state. Fasting increases olfactory performances, notably by increasing neuronal activity in the olfactory bulb (OB). Within the OB glomeruli, the glutamatergic synapses between olfactory sensory neurons and mitral cells are regulated by astrocytes, periglomerular neurons and centrifugal afferents. Astrocytes, which support mechanisms of metaplasticity in the brain, may drive the metabolic regulation of the olfactory response in the OB. To test whether OB glomerular astrocytes are involved in the metabolic sensing of the olfactory system, we compared the astroglial processes expansion by quantification of the GFAP-labelled area in fed and fasted rats. Astroglial spreading was markedly increased in

fasting rats, as compared to fed rats, in all regions of the OB after 17h-fasting. Intra-peritoneal administration of the anorexigenic peptide PYY3-36 or glucose in 17h-fasted rats respectively decreased their food intake or restored their glycemia and both reversed the increased astroglial deployment induced by fasting. Direct application of orexigenic peptides ghrelin and NPY on OB acute slices, resulted in an increase of the astroglial deployment, whereas application of PYY3-36 oppositely resulted in astroglial retraction within the glomeruli. These results are in close agreement with the effects of fasting or satiation on the morphology of astrocytes.

The deployment of the glomerular astroglial processes clearly varies according to the metabolic state of the rats, and is influenced by food intake regulatory peptides. This plasticity may participate in the adaptation of the olfactory sensitivity to food intake.