



**HAL**  
open science

# Impact d'une alimentation maternelle riche en graisse et en sucre pendant les périodes de préconception, gestation et lactation sur la physiologie olfactive de la progéniture : étude expérimentale chez la souris

Laëtitia Merle

## ► To cite this version:

Laëtitia Merle. Impact d'une alimentation maternelle riche en graisse et en sucre pendant les périodes de préconception, gestation et lactation sur la physiologie olfactive de la progéniture : étude expérimentale chez la souris. Neurosciences [q-bio.NC]. Université Bourgogne Franche-Comté, 2018. Français. NNT : 2018UBFCK056 . tel-01997475

**HAL Id: tel-01997475**

**<https://theses.hal.science/tel-01997475>**

Submitted on 29 Jan 2019

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

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

**THESE DE DOCTORAT**  
**DE L'ÉTABLISSEMENT UNIVERSITE BOURGOGNE FRANCHE-COMTE**  
**PREPAREE AU CENTRE DES SCIENCES DU GOUT ET DE L'ALIMENTATION**

Ecole doctorale n°554

Environnements-Santé

Doctorat de Neurosciences

Par

Laëtitia MERLE

**Impact d'une alimentation maternelle riche en graisse et en sucre pendant les périodes de préconception, gestation et lactation sur la physiologie olfactive de la progéniture : étude expérimentale chez la souris.**

*Thèse présentée et soutenue à Dijon, le 17 Décembre 2018*

Composition du Jury :

Pr. Corinne LELOUP  
Dr. Nathalie MANDAIRON  
Dr. Guillaume FERREIRA  
Dr. Nicolas MEUNIER  
Dr. Xavier GROSMAITRE  
Dr. David JARRIAULT

Professeure des universités (UBFC) - Présidente  
Directrice de recherche (CNRS) - Rapportrice  
Directeur de recherche (INRA) - Rapporteur  
Maître de conférences (UVSQ) - Examineur  
Directeur de recherche (CNRS) - Directeur de thèse  
Chargé de recherche (INRA) - Co-directeur de thèse



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

**Titre :** Impact d'une alimentation maternelle riche en graisse et en sucre pendant les périodes de préconception, gestation et lactation sur la physiologie olfactive de la progéniture : étude expérimentale chez la souris.

**Mots clés :** olfaction, alimentation maternelle, comportement, pléthysmographie, électroolfactogramme, neurones olfactifs.

**Résumé :** L'alimentation maternelle conditionne la santé métabolique et cardiovasculaire de la progéniture, mais l'impact sur les systèmes sensoriels reste peu étudié. L'olfaction joue un rôle comportemental crucial pour l'évitement des dangers et pour la prise alimentaire. Dès le plus jeune âge, les odeurs participent à l'établissement des préférences alimentaires, qui influencent les habitudes alimentaires de l'adulte. Le système olfactif repose sur le fonctionnement de neurones qui se développent pendant la vie embryonnaire, continuent leur maturation après la naissance et sont continuellement régénérés au cours de la vie. Ces neurones sont en permanence modulés par les facteurs métaboliques. Les patients atteints de troubles métaboliques ont plus de risques de présenter des altérations de la perception des odeurs, et l'exposition à une alimentation de type obésogène ou diabétogène induit des perturbations olfactives chez le rongeur.

Le but de cette thèse était d'explorer les effets d'une exposition périnatale au gras et au sucre, à travers l'alimentation maternelle pendant les périodes de préconception, gestation et lactation, sur la physiologie olfactive de souris juvéniles.

L'alimentation grasse et sucrée (*high-fat high-sucrose*, HFHS) a modifié la composition lipidique du lait maternel.

La caractérisation métabolique des petits a révélé un surpoids, un excès de masse grasse épидидymaire et une hyperleptinémie chez les petits provenant d'une mère sous alimentation HFHS. Les capacités olfactives évaluées lors d'un test de nourriture enfouie et par mesure du comportement de flairage induit par les odeurs étaient altérées chez les petits dont la mère a été exposée à l'alimentation HFHS. Cependant, nos résultats n'ont pas montré de modification de la sensibilité de l'épithélium olfactif (EO) ou de l'expression des gènes codant pour les éléments de la cascade de transduction olfactive. L'exploration du traitement central du signal olfactif a révélé un impact de l'alimentation maternelle HFHS sur le degré de ramification dendritique des interneurons du bulbe olfactif. En revanche, l'activation des neurones dans le cortex piriforme après une exposition odorante n'était pas modifiée.

Ainsi, l'alimentation maternelle HFHS pendant les périodes de développement des petits induit chez les mâles des altérations de la perception olfactive, sans perturbation de la détection des odeurs par l'EO, mais associées à des modifications neuronales dans les structures olfactives centrales. La leptine, hormone métabolique connue pour son action sur l'olfaction et sur le développement neuronal, pourrait être à l'origine de ces déficits olfactifs.



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

**Title:** Impact of a high-fat high-sugar maternal diet during preconception, gestation and lactation on progeny's olfactory system: experimental study in mice.

**Keywords:** olfaction, maternal diet, behavior, plethysmography, electroolfactogram, olfactory neurons.

**Abstract:** The influence of maternal diet on progeny's health has been thoroughly investigated regarding metabolic and cardiovascular diseases, but the impact on sensory systems remains unknown. Olfaction is of great behavioral importance for avoiding hazards and for feeding behavior. In childhood especially, olfaction participates in establishing food preferences, which partly determine adult eating habits. The olfactory system is made of sensory neurons that develop during the embryonic life, pursue their maturation after birth and are continuously regenerated over life. Olfactory neurons activity can be modulated by metabolic factors. Patients with metabolic disorders are at risk of impaired olfactory sensitivity. Adult mice exposed to an obesogenic or diabetogenic diet exhibit disrupted olfactory behavior.

The aim of this thesis was to investigate the effect of a perinatal exposure to fat and sugar, through maternal diet during preconception, gestation and lactation, on the olfactory system of young mice.

Maternal high fat high sugar (HFHS) diet modified milk lipids composition.

When investigating pups' metabolic phenotype, overweight, increased epididymal fat and hyperleptinemia were revealed in pups born from dams fed with the HFHS diet. Olfactory abilities were assessed in a buried food test and by measuring odor-induced sniffing behavior and were disrupted in the progeny of HFHS diet fed dams. However, olfactory epithelium sensitivity (OE) and gene expression of constituents of the olfactory transduction cascade were not affected by maternal HFHS diet. When investigating olfactory central processing, dendritic complexity of interneurons in the olfactory bulb was found to be affected by maternal HFHS diet. Meanwhile, neuronal activation in piriform cortex was not altered.

These results show that maternal HFHS diet during pups' development alters olfactory perception in male progeny, without impairing odor detection by the OE, and associated with neuronal modifications in olfactory central areas. Leptin is a metabolic hormone known to influence olfaction and neurons development which could have induced the olfactory defects.

*“Sometimes shifting your perspective is more powerful than being smart”*

**Astro Teller**

# Remerciements

---

Toutes les bonnes choses ont une fin. Mais la fin d'une aventure permet surtout d'en commencer une nouvelle ! Avant de vous embarquer avec moi dans le récit de ma thèse, je souhaite adresser mes remerciements à toutes les personnes qui ont participé de près ou de loin à écrire cette histoire.

Tout d'abord je remercie les membres du jury pour avoir accepté d'évaluer mes travaux de thèse. Merci à mes deux rapporteurs, Nathalie Mandairon et Guillaume Ferreira, d'avoir pris le temps de parcourir avec attention ce manuscrit. Votre expertise et vos conseils me seront précieux dans la poursuite de mes recherches. Je remercie également Nicolas Meunier pour les discussions enrichissantes lors de mes comités de suivi de thèse et pour avoir accepté d'être examinateur de cette thèse. Merci également à Corinne Leloup d'avoir accepté de juger ce travail et de présider le jury.

Le projet a pour origine un sujet de thèse publié dans les listes de l'Ecole Doctorale de Dijon. Après une opportunité de thèse tombée à l'eau dans mon laboratoire de master 2, j'ai tenté ma chance un peu par hasard en contactant les deux porteurs du projet, qui suite à un oral fructueux sont devenus mes directeurs de thèse.

Xavier, merci de m'avoir fait confiance pour mener ce projet avec une grande autonomie, et pour avoir toujours gardé un œil sur l'avancée des travaux même si lorsque tu étais à l'autre bout du monde. Ton humilité et ton ouverture d'esprit sont des qualités que j'apprécie chez toi. Je te souhaite une bonne continuation dans tes nouvelles fonctions au Canada !

David, merci d'avoir toujours été disponible pour me guider au travers des différentes approches expérimentales. Merci également de m'avoir initiée au traitement de données sous Matlab, j'ai développé un certain intérêt pour la programmation qui me servira certainement dans mes futurs travaux ! Tu es quelqu'un de curieux et créatif, une bonne combinaison pour mener à bien de futurs projets scientifiques.

Votre sympathie et votre confiance m'ont permis de réaliser cette thèse dans les meilleures conditions possibles. Vous m'avez tous les deux appris à développer les compétences nécessaires au métier de chercheur et grâce à vous, l'étudiante un peu hésitante que j'étais est devenue une jeune chercheuse plus sûre de ses ambitions professionnelles.

Je remercie la direction du CSGA, menée par Luc Pénicaud puis Lionel Breillon, pour m'avoir accueillie au sein de leur laboratoire de recherche. Merci également à tout le personnel

administratif pour leur gestion des commandes et des déplacements professionnels, votre efficacité nous évite bien des crises de nerfs. Un grand merci à Cédric, l'homme de main du labo, pour être venu régulièrement remplacer les ampoules grillées et pour avoir essayé tant bien que mal de gérer la température ambiante du bureau. Merci à Mich-Mich le bricoleur pour la confection des petits objets pour les journées des doctorants. Et merci à l'équipe informatique du centre pour leur grande réactivité dans les divers dépannages d'ordinateur.

On imagine souvent le chercheur comme un être marginal aux idées loufoques, seul dans son bureau mais pas tout à fait seul dans sa tête. Je ne m'avancerais pas sur le degré d'habitation du cerveau d'un chercheur, mais en tout cas il est loin de travailler seul.

Je remercie donc tous les membres de l'équipe 4 du CSGA pour leur aide au cours des différentes étapes du projet. Vanessa, merci pour ta contribution aux manip de biologie moléculaire, et bon courage pour l'avancée de ta thèse ! Sylvie, merci beaucoup d'avoir réalisé les manip d'immunohistochimie, même si parfois c'était demandé dans la précipitation. Frédérique, merci pour les discussions sur les manip d'anatomie fonctionnelle, et merci d'avoir fait partie mon comité de suivi de thèse. Anne-Marie et Jean, merci pour vos conseils avisés. Et merci à tous pour votre bonne humeur quotidienne et lors des repas d'équipe.

Je tenais à remercier tous les stagiaires qui ont passé quelques jours ou quelques mois au sein de l'équipe, c'est toujours plaisant discuter de son travail avec des personnes désireuses de découvrir les neurosciences. Un merci tout particulier à Ophélie et Pierre : vous avez contribué à l'acquisition d'une partie des résultats, vous avez travaillé avec rigueur et efficacité et c'était un réel plaisir de vous encadrer. Je vous souhaite une bonne continuation dans vos études et dans votre vie professionnelle.

Je remercie plus généralement tous le personnel du CSGA pour les discussions scientifiques ou personnelles tout au long de ces 3 années, et notamment pour les moments d'échanges lors des journées des doctorants. Un grand merci à Stéphane pour avoir réalisé les dosages des lipides du lait, et merci à Bruno pour m'avoir formée à la traite des souris. Merci également à Alexandre pour les conseils sur le modèle expérimental et sur l'orientation générale du projet.

A tous mes collègues thésards, tenez bon ! La thèse a parfois ses moments difficiles mais elle nous permet de nous surpasser et de découvrir des facettes de notre personnalité. Je vous souhaite à tous une belle réussite dans votre carrière.

Une mention spéciale aux doctorants que j'ai le plus côtoyés : les « anciens », Sébastien, Lucie et Chloé, merci pour vos conseils et votre expérience lorsque j'ai débarqué dans votre bureau. Danaé, merci d'avoir été ma voisine dans ce grand bureau vide pendant la majeure partie de ma thèse, et merci à Selma d'avoir pris le relais, bon courage à toi pour tes analyses d'image surtout ! Merci également à Magali pour les prêts récurrents de plaques chauffantes, à Aline pour les moments sympas à l'Experimentarium, au Forum des Jeunes Chercheurs et à l'ACheM5, et à Elise, Mayssa et Rémy d'avoir subi avec moi les journées interminables de la formation expérimentation animale. Merci à tous pour les moments passés dans les diverses manifestations scientifiques !

Un immense merci au personnel de l'animalerie, sans qui toutes les études expérimentales sur les rongeurs ne pourraient tout bonnement pas avoir lieu.

Alexia, je ne te remercie pas pour avoir piqué ma place de vélo à plusieurs reprises quand j'avais du mal à me lever le matin, mais merci pour ta gestion de l'intégralité du plateau technique animalerie. Anne, merci pour ta bienveillance et pour le soin apporté aux animaux, Martin, merci pour tes rappels et conseils dans la gestion des cohortes de souris. Merci également à Patrick, nouvellement arrivé, et je te souhaite de te plaire dans ta reconversion.

J'exprime mes remerciements à l'équipe pédagogique de l'UFR SVTE pour m'avoir permis d'encadrer des TP de physiologie animale pendant mes deux dernières années de thèse. Cette expérience a confirmé ma volonté d'exercer une activité d'enseignement associée à la recherche.

Merci à toute l'équipe de la Mission Culture Scientifique de l'uB et de l'Experimentarium qui m'ont formée aux exercices de vulgarisation sous différents formats. La communication avec les scolaires et le grand public est essentielle au métier de chercheur et j'ai pris beaucoup de plaisir à échanger avec différents publics. Merci Coralie pour ton enthousiasme et ton organisation sans faille face à des collégiens amorphes ou turbulents !

Enfin, pour la touche un peu plus personnelle, merci à *The Best of Bourgogne* pour les jours de l'an, demi-jours de l'an et autres week-end passés en votre compagnie. On est des grands maintenant qu'on organise des vrais repas, mais les parties de loup-garou de fin de soirées restent incontournables !

A mon Papa, merci de te préoccuper toujours autant de ta fille préférée. Yannick et Yoann, s'il y a bien une ligne que vous pouvez lire et retenir de ce manuscrit c'est celle-ci : oui, on va l'arroser cette thèse !

Je remercie également ma belle maman et mon beau papa pour leur affection et leur soutien, merci à mes deux (belles) sœurs de m'apporter une deuxième famille. Yoan, merci pour les soirées raclette ! Un immense merci à Sophie, ce petit distributeur de sourires, pour apporter une joie et un bonheur incroyables au sein de cette famille.

Mon épousé, mille merci pour ton soutien au quotidien, tes encouragements et ta compréhension. Merci de rendre le bonheur si accessible et la vie si agréable. Cette thèse restera marquée par la question existentielle que tu m'as posée et qui nous entraînera vers de nouvelles aventures.

**"Courage is the magic that turns dreams into reality"**

# Table des matières

---

LISTE DES ABREVIATIONS.....	1
LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX.....	3
LISTE DES ANNEXES .....	6
<b>DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES.....</b>	<b>7</b>
<b>PREAMBULE.....</b>	<b>8</b>
<b>PARTIE 1 : L'ALIMENTATION MATERNELLE .....</b>	<b>9</b>
I. LES ORIGINES DEVELOPPEMENTALES DE LA SANTE ET DES MALADIES.....	9
1. L'environnement nutritionnel prénatal .....	10
a) <i>Notion d'environnement intra-utérin optimal.....</i>	<i>10</i>
b) <i>Restriction maternelle : l'hypothèse du phénotype prudent.....</i>	<i>11</i>
c) <i>Obésité maternelle et alimentation riche en graisses et en sucres.....</i>	<i>12</i>
2. L'environnement nutritionnel postnatal .....	13
a) <i>Sous-nutrition postnatale .....</i>	<i>13</i>
b) <i>Suralimentation postnatale.....</i>	<i>13</i>
II. ALIMENTATION MATERNELLE ET CONSEQUENCES SUR LA SANTE METABOLIQUE DE LA PROGENITURE.....	14
1. Poids corporel et adiposité .....	15
2. Métabolisme glucidique et signalisation à l'insuline .....	15
3. Profil lipidique sanguin .....	16
4. Signalisation à la leptine.....	16
III. ALIMENTATION MATERNELLE ET ATTEINTES CEREBRALES CHEZ LA PROGENITURE.....	18
1. Neuro-inflammation .....	18
2. Prolifération, différenciation neuronale et projections axonales.....	19
3. Morphologie dendritique.....	20
<b>PARTIE 2 : BASES ANATOMIQUES ET FONCTIONNELLES DE L'OLFACTION .....</b>	<b>22</b>
I. ROLE ET IMPORTANCE DES ODEURS .....	23
1. Définition d'une odeur.....	23
2. Olfaction et relations sociales .....	23
3. Les odeurs permettent de détecter des dangers.....	24
4. Odeurs et comportement alimentaire .....	25
a) <i>Initiation de la prise alimentaire.....</i>	<i>26</i>

b) <i>Maintien de la prise alimentaire</i> .....	28
c) <i>Arrêt de la prise alimentaire</i> .....	30
II. DETECTION DES ODEURS PAR LE SYSTEME OLFACTIF PERIPHERIQUE .....	31
1. Organisation générale du système olfactif périphérique .....	31
2. Anatomie de l'EO principal.....	32
a) <i>Le mucus</i> .....	33
b) <i>Les neurones sensoriels olfactifs</i> .....	33
c) <i>Les cellules à microvillosités</i> .....	36
d) <i>Les cellules de soutien</i> .....	36
e) <i>Les cellules basales</i> .....	36
f) <i>Les cellules engainantes</i> .....	37
3. Transduction du signal olfactif dans l'EO principal.....	37
a) <i>Les récepteurs olfactifs</i> .....	37
b) <i>La cascade de signalisation</i> .....	39
4. Un organe olfactif particulier : l'organe septal .....	44
a) <i>Localisation et anatomie</i> .....	44
b) <i>Développement</i> .....	45
c) <i>Récepteurs olfactifs et transduction dans l'organe septal</i> .....	46
d) <i>Rôle(s) de l'organe septal</i> .....	46
III. PERCEPTION DES ODEURS PAR LE SYSTEME OLFACTIF CENTRAL .....	47
1. Les connexions épithélio-bulbaires .....	47
2. Le bulbe olfactif, premier relais central de l'information olfactive .....	49
a) <i>Organisation anatomique du bulbe olfactif</i> .....	49
b) <i>Intégration bulbaire de l'information olfactive</i> .....	53
3. Traitement supérieur du signal olfactif.....	57
a) <i>Le cortex olfactif</i> .....	57
b) <i>Les structures olfactives tertiaires</i> .....	60
c) <i>Les afférences centrales sur le BO</i> .....	62
IV. LE CODAGE DES ODEURS PAR LE SYSTEME OLFACTIF .....	63
1. Identité de l'odeur .....	63
2. Intensité de l'odeur.....	64
3. Valence de l'odeur .....	65
V. DEVELOPPEMENT ET PLASTICITE DU SYSTEME OLFACTIF .....	66
1. La construction du système olfactif .....	66
a) <i>Mise en place au cours du développement embryonnaire</i> .....	67
b) <i>Développement postnatal</i> .....	67
2. La plasticité du système olfactif .....	68

a) <i>Le renouvellement continu de l'épithélium olfactif</i> .....	68
b) <i>La neurogenèse adulte dans le bulbe olfactif</i> .....	69
<b>PARTIE 3 : L'OLFACTION SOUS INFLUENCE METABOLIQUE</b> .....	<b>71</b>
I. MODULATION DES STRUCTURES DU SYSTEME OLFACTIF PAR LES PEPTIDES ET HORMONES DU METABOLISME .....	71
1. Les facteurs orexigènes.....	72
a) <i>La ghréline</i> .....	72
b) <i>Les orexines</i> .....	72
c) <i>Le neuropeptide Y</i> .....	73
d) <i>Les endocannabinoïdes</i> .....	73
e) <i>Les opioïdes endogènes</i> .....	73
2. Les facteurs anorexigènes .....	74
a) <i>L'insuline</i> .....	74
b) <i>La leptine</i> .....	75
c) <i>L'adiponectine</i> .....	76
d) <i>La cholecystokinine</i> .....	76
e) <i>Le glucose</i> .....	76
II. STATUT NUTRITIONNEL ET CAPACITES OLFACTIVES .....	77
1. Données chez l'homme .....	78
2. Données chez le rongeur.....	79
III. PATHOLOGIES METABOLIQUES ET OLFACTION .....	80
1. Obésité.....	80
2. Diabète.....	82
<b>PARTIE 4 : PROBLEMATIQUE ET OBJECTIFS</b> .....	<b>85</b>
<b>RESULTATS EXPERIMENTAUX</b> .....	<b>87</b>
<b>PROCOLE EXPERIMENTAL GENERAL</b> .....	<b>88</b>
I. CARACTERISTIQUES DES REGIMES UTILISES .....	88
II. ANIMAUX ET EXPOSITION AU REGIME HFHS.....	89
1. Design expérimental 1 .....	90
2. Design expérimental 2 .....	91
<b>OBJECTIF 1 : CARACTERISATION METABOLIQUE DU MODELE</b> .....	<b>93</b>
I. IMPACT METABOLIQUE DE L'ALIMENTATION HFHS SUR LES MERES .....	93
1. Effet du régime HFHS pendant les deux mois de préconception.....	93
2. Poids et prise alimentaire pendant la gestation et la lactation .....	96

3.	Impact de l'alimentation HFHS sur la taille des portées et la mortalité à la naissance .....	97
4.	Impact de l'alimentation HFHS sur la production et la composition du lait maternel.....	99
5.	Bilan sur l'état métabolique des mères sous alimentation HFHS .....	103
II.	IMPACT METABOLIQUE DE L'ALIMENTATION MATERNELLE HFHS SUR LA PROGENITURE .....	104
<b>OBJECTIF 2 : ETUDE DU COMPORTEMENT OLFACTIF.....</b>		<b>108</b>
I.	CAPACITES OLFACTIVES GENERALES ENVERS UNE ODEUR ALIMENTAIRE.....	108
1.	Protocole .....	108
a)	<i>Procédure d'habituation au Crunch .....</i>	<i>109</i>
b)	<i>Déroulement du test de nourriture enfouie.....</i>	<i>109</i>
c)	<i>Contrôle du comportement de fouissage .....</i>	<i>111</i>
2.	Résultats et interprétation .....	111
II.	COMPORTEMENT DE FLAIRAGE INDUIT PAR UNE ODEUR NON ALIMENTAIRE .....	115
1.	Protocole .....	116
a)	<i>Dispositif expérimental : la technique de pléthysmographie.....</i>	<i>116</i>
b)	<i>Déroulement du test.....</i>	<i>117</i>
c)	<i>Traitement du signal et extraction des données.....</i>	<i>119</i>
2.	Résultats et interprétation .....	123
<b>OBJECTIF 3 : ETUDE DU FONCTIONNEMENT DE LA MUQUEUSE OLFACTIVE.....</b>		<b>127</b>
I.	EXPRESSION GENIQUE AU SEIN DE LA MUQUEUSE OLFACTIVE .....	127
1.	Protocole .....	128
a)	<i>Prélèvement du tissu .....</i>	<i>128</i>
b)	<i>Extraction des ARNm et transcription inverse.....</i>	<i>128</i>
c)	<i>Amplification des régions d'intérêt par qPCR.....</i>	<i>129</i>
2.	Résultats et interprétation .....	130
II.	SENSIBILITE DE LA MUQUEUSE OLFACTIVE .....	132
1.	Protocole .....	132
a)	<i>Dispositif expérimental : le poste d'enregistrement EOG.....</i>	<i>132</i>
b)	<i>Déroulement de la procédure .....</i>	<i>133</i>
c)	<i>Traitement du signal EOG et extraction des données .....</i>	<i>135</i>
2.	Résultats et interprétation .....	137
a)	<i>Enregistrements sur l'EO principal.....</i>	<i>138</i>
b)	<i>Enregistrements sur l'OS.....</i>	<i>142</i>
3.	Bilan de l'étude EOG .....	148

## **OBJECTIF 4 : ETUDE DU TRAITEMENT CENTRAL DE L'INFORMATION OLFACTIVE**

.....	<b>151</b>
I. ARBORISATION DENDRITIQUE DES CELLULES GC DANS LE BO.....	152
1. Protocole expérimental .....	152
a) <i>Dissection et prélèvement du BO</i> .....	152
b) <i>Imprégnation du tissu et coupes transversales</i> .....	152
c) <i>Développement des lames</i> .....	153
d) <i>Analyse de la morphologie des cellules GC</i> .....	154
2. Résultats et interprétation .....	156
II. ACTIVATION DES STRUCTURES OLFACTIVES CENTRALES APRES UNE BREVE EXPOSITION ODORANTE.....	160
1. Protocole expérimental .....	160
a) <i>Préparation des animaux et exposition odorante</i> .....	160
b) <i>Fixation et prélèvement du cerveau</i> .....	161
c) <i>Immuno-détection de la protéine c-Fos</i> .....	161
d) <i>Analyse du marquage dans les zones d'intérêt</i> .....	162
2. Résultats et interprétation .....	163

## **OBJECTIF 5 : COMPARAISON AVEC DES REGIMES MATERNELS NORMO- LIPIDIQUES, DEFICIENTS OU ENRICHIS EN AGPI N-3 ..... 165**

I. CARACTERISTIQUES DES REGIMES UTILISES .....	166
II. COMPORTEMENT DE FLAIRAGE INDUIT PAR LE PEA .....	167
III. ACTIVITE ELECTROPHYSIOLOGIQUE DE L'EO EN REPOSE AU PEA .....	168

## **DISCUSSION GENERALE.....171**

I. ALIMENTATION MATERNELLE HFHS ET COMPORTEMENT OLFACTIF DES PETITS AU MOMENT DU SEVRAGE .....	172
II. IMPLICATION DES HORMONES METABOLIQUES DANS LES DEFICITS OLFACTIFS .....	175
1. Causes des perturbations métaboliques.....	175
2. Les perturbations métaboliques au sevrage peuvent affecter le fonctionnement du système olfactif .....	176
3. Les perturbations métaboliques périnatales peuvent affecter le développement du système olfactif .....	179
a) <i>Développement in utéro</i> .....	179
b) <i>Développement postnatal</i> .....	180
III. IMPLICATION DES DIFFERENTS ACIDES GRAS DANS LES DEFICITS OLFACTIFS .....	180

1. Acides gras et fonctionnement du système olfactif .....	181
2. Acides gras et développement du système olfactif .....	182
IV. L'EXPOSITION ODORANTE PRECOCE .....	183
V. ALIMENTATION MATERNELLE, STRESS ET OLFACTION .....	184
<b>CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....</b>	<b>185</b>
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES .....</b>	<b>188</b>
ANNEXE 1 : MANUSCRIT SOUMIS DANS LE JOURNAL <i>PSYCHONEUROENDOCRINOLOGY</i> .....	219
ANNEXE 2 : LISTE DES COMMUNICATIONS SCIENTIFIQUES.....	248
ANNEXE 3 : LISTE DES ENSEIGNEMENTS .....	249

# Liste des abréviations

---

<b>ACIII</b>	Adénylyl cyclase de type III	<b>GMP</b>	Guanosine monophosphate
<b>ACE</b>	Acétophénone	<b>Golf</b>	Protéine G spécifique des OSNs
<b>AG</b>	Acide gras	<b>GTT</b>	Glucose tolerance test
<b>AGMI</b>	Acide gras mono-insaturé	<b>HFHS</b>	High-fat high-sucrose
<b>AGPI</b>	Acide gras polyinsaturé	<b>HRP</b>	Horseradish peroxidase
<b>AgRP</b>	Agouti-related peptide	<b>ICV</b>	Intra-cérébro-ventriculaire
<b>AGS</b>	Acide gras saturé	<b>IL-6</b>	Interleukine 6
<b>AMPc</b>	Adénosine monophosphate cyclique	<b>IMC</b>	Indice de masse corporelle
<b>ATP</b>	Adénosine triphosphate	<b>Ins-R</b>	Récepteur à l'insuline
<b>BDNF</b>	Brain-derived neurotrophic factor	<b>i.p.</b>	Intra-péritonéale
<b>BO</b>	Bulbe olfactif	<b>IP3</b>	Inositol 1,4,5-triphosphate
<b>CaMK</b>	Calmoduline kinase	<b>IRM</b>	Imagerie par résonance magnétique
<b>CB</b>	Récepteur aux cannabinoïdes	<b>IRS</b>	Insulin receptor substrate
<b>CCK</b>	Cholecystokinine	<b>JG</b>	Cellules juxtaglomérulaires
<b>CNG</b>	Cyclic nucleotide-gated channel	<b>KCC</b>	Co-transporteur K <sup>+</sup> /Cl <sup>-</sup>
<b>CTRL</b>	Groupe contrôle	<b>KO</b>	Knock-out
<b>DEF</b>	Groupe déficient en AGPI n-3	<b>L10</b>	Jour de lactation 10
<b>DIO</b>	Diet-induced obesity	<b>Lept-R</b>	Récepteur à la leptine
<b>DMSO</b>	Diméthylsulfoxyde	<b>LOT</b>	Tractus olfactif latéral
<b>DNS</b>	Acide 3,5-dinitrosalicylique	<b>MC4R</b>	Melanocortin 4 receptor
<b>dSA</b>	Cellules profondes à axone court	<b>MO</b>	Muqueuse olfactive
<b>E10</b>	Jour embryonnaire 10	<b>MSH</b>	Melanocyte-stimulating hormone
<b>ENR</b>	Groupe enrichi en AGPI n-3	<b>NCX</b>	Echangeur Na <sup>+</sup> /Ca <sup>2+</sup>
<b>EO</b>	Epithélium olfactif	<b>NPY</b>	Neuropeptide Y
<b>EOG</b>	Electro-olfactogramme	<b>OBP</b>	Olfactory binding proteins
<b>EQU</b>	Groupe équilibré en AGPI n-3	<b>OEC</b>	Olfactory ensheathing cell
<b>ET</b>	Cellules externes à panache	<b>OFC</b>	Cortex orbito-frontal
<b>FGF</b>	Fibroblast growth factor	<b>OMP</b>	Olfactory marker protein
<b>G21</b>	Jour gestationnel 21	<b>OMS</b>	Organisation mondiale de la santé
<b>GABA</b>	Acide γ-aminobutyrique	<b>ORK</b>	Olfactory receptor kinase
<b>GC</b>	Cellules granulaires	<b>OS</b>	organe septal
<b>GC-D</b>	Guanylyl cyclase D	<b>OSN</b>	Neurone sensoriel olfactif
<b>GFP</b>	Protéine de fluorescence verte	<b>OVN</b>	Organe voméronasal
<b>GG</b>	Ganglion de Grueneberg	<b>PA</b>	Potentiel d'action
<b>GHSR</b>	Récepteur à la ghréline	<b>PDE</b>	Phosphodiesterase
<b>GLUT</b>	Transporteur membranaire du glucose	<b>PEA</b>	Phényléthanol

**PFA** Paraformaldéhyde  
**PG** Cellules périglomérulaires  
**PI3K** Phosphoinositide 3 kinase  
**PIP2** Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate  
**PIP3** Phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate  
**PKA** Protéine kinase A  
**PLC** Phospholipase C  
**PND** Jour postnatal  
**POMC** Pro-opiomélanocortine  
**PMCA** Plasma membrane calcium ATPase  
**RCPG** Récepteur couplé à une protéine G  
**RGS2** Regulator of G-protein signaling  
**RMS** Courant migratoire rostral  
**RO** Récepteur olfactif  
**SD** Régime standard  
**SGLT** Co-transporteur sodium-glucose  
**sSA** Cellules superficielles à axone court  
**SVZ** Zone subventriculaire  
**TAAR** Trace amine-associated receptors  
**TGF** Transforming growth factor  
**TMT** 2,5-dihydro-2,4,5-trimethylthiazoline  
**TNF** Facteur de nécrose tumorale  
**TRP** Transient receptor potential  
**TRPC** TRP de type canal cationique  
**TRPM** TRP de type mélastatine

# Liste des figures et tableaux

---

<b>Figure 1</b> : Modèle intégré des afférences sensorielles au niveau du système nerveux central régulant l'homéostasie énergétique et la prise alimentaire hédonique .....	29
<b>Figure 2</b> : Le système olfactif de la souris .....	32
<b>Figure 3</b> : Représentation schématique de l'EO principal.....	33
<b>Figure 4</b> : Structure d'un OSN .....	34
<b>Figure 5</b> : Représentation de la cascade de signalisation AMPc-dépendante .....	40
<b>Figure 6</b> : Représentation de la cascade de signalisation IP <sub>3</sub> -dépendante.....	44
<b>Figure 7</b> : Visualisation de l'organe septal au microscope à contraste interférentiel différentiel .....	45
<b>Figure 8</b> : Projections axonales des neurones exprimant un même récepteur olfactif .....	48
<b>Figure 9</b> : Localisation et anatomie du bulbe olfactif de souris .....	49
<b>Figure 10</b> : Modélisation du réseau neuronal au sein du bulbe olfactif .....	51
<b>Figure 11</b> : Représentation schématique des connexions axonales entre l'épithélium olfactif et le bulbe olfactif .....	54
<b>Figure 12</b> : Fonctionnement d'une synapse réciproque dendro-dendritique .....	56
<b>Figure 13</b> : Représentation simplifiée des projections du bulbe olfactif vers les structures cérébrales intégrant le message olfactif.....	58
<b>Figure 14</b> : Schématisation de la circuiterie neuronale au sein du cortex piriforme.....	58
<b>Figure 15</b> : Schématisation du codage combinatoire des odorants .....	64
<b>Figure 16</b> : Composition énergétique des régimes .....	89
<b>Figure 17</b> : Protocoles expérimentaux de mise sous régime.....	91
<b>Figure 18</b> : Suivi du poids et de la prise alimentaire des femelles pendant les deux mois de préconception .....	94
<b>Figure 19</b> : Evaluation de la tolérance au glucose après 2 mois de régime SD ou HFHS ....	95
<b>Figure 20</b> : Poids et prise alimentaire des mères pendant la gestation et la lactation .....	96
<b>Figure 21</b> : Caractéristiques des portées issues des femelles sous régime SD ou HFHS .....	98
<b>Figure 22</b> : Evaluation du volume de lait produit en milieu de lactation.....	99
<b>Figure 23</b> : Conséquences métaboliques de l'alimentation maternelle HFHS sur les petits	106
<b>Figure 24</b> : Représentation des 8 cadrans définis au sein des cages individuelles utilisées pour le test de nourriture enfouie .....	110
<b>Figure 25</b> : Performance olfactive évaluée par un test de nourriture enfouie.....	112
<b>Figure 26</b> : Quantification de 4 comportements basiques sur une période libre de 10 min	113

<b>Figure 27</b> : Dispositif expérimental d'enregistrement de l'activité respiratoire des souriceaux en réponse à des stimulations odorantes à l'aide d'un pléthysmographe.....	117
<b>Figure 28</b> : Différentes étapes du traitement du signal enregistré dans le pléthysmographe .....	121
<b>Figure 29</b> : Comportement de flairage induit par l'odeur du PEA dans un dispositif de pléthysmographie.....	124
<b>Figure 30</b> : Représentation schématique des étapes de dissection du museau de souris pour prélever l'épithélium olfactif.....	128
<b>Figure 31</b> : Expression génique au sein de la MO des souriceaux des 3 groupes.....	131
<b>Figure 32</b> : Dispositif expérimental permettant d'enregistrer par EOG la réponse de la MO à des stimulations odorantes.....	133
<b>Figure 33</b> : Structure chimique des odorants utilisés en EOG.....	133
<b>Figure 34</b> : Caractéristiques mesurées sur les signaux EOG .....	135
<b>Figure 35</b> : Analyse de l'amplitude du signal EOG en fonction de la concentration odorante .....	136
<b>Figure 36</b> : Données obtenues en EOG pour des stimulations du cornet III avec des concentrations croissantes de PEA – Groupe HFHS gest-lact vs SD 1.....	138
<b>Figure 37</b> : Données obtenues en EOG pour des stimulations du cornet III avec des concentrations croissantes de PEA – Groupe HFHS 8w + gest-lact vs SD 3.....	139
<b>Figure 38</b> : Données obtenues en EOG pour des stimulations du cornet III avec des concentrations croissantes de ACE – Groupe HFHS gest-lact vs SD 1 .....	140
<b>Figure 39</b> : Données obtenues en EOG pour des stimulations du cornet III avec des concentrations croissantes de ACE – Groupe HFHS 8w + gest-lact vs SD 3.....	141
<b>Figure 40</b> : Données obtenues en EOG pour des stimulations de l'organe septal avec des concentrations croissantes de PEA – Groupe HFHS gest-lact vs SD 1.....	142
<b>Figure 41</b> : Données obtenues en EOG pour des stimulations de l'organe septal avec des concentrations croissantes de PEA – Groupe HFHS 8w + gest-lact vs SD 3.....	143
<b>Figure 42</b> : Données obtenues en EOG pour des stimulations de l'organe septal avec des concentrations croissantes de ACE – Groupe HFHS gest-lact vs SD 1 .....	144
<b>Figure 43</b> : Données obtenues en EOG pour des stimulations de l'organe septal avec des concentrations croissantes de ACE – Groupe HFHS 8w + gest-lact vs SD 3.....	145
<b>Figure 44</b> : Représentation schématique de signaux EOG individuels pour une stimulation de l'OS avec le PEA à $10^{-3}$ M pour les groupes HFHS 8w + gest-lact et SD 3.....	146
<b>Figure 45</b> : Représentation schématique de signaux EOG individuels pour une stimulation de l'OS avec l'ACE à $10^{-3}$ M pour les groupes HFHS gest-lact et SD 1 .....	147

<b>Figure 46</b> : Représentation schématique de signaux EOG individuels pour des stimulations de l'OS avec des concentrations croissantes d'ACE pour les groupes HFHS 8w + gest-lact et SD 3.....	148
<b>Figure 47</b> : Marquage des neurones bulbaires selon la méthode Golgi Cox.....	155
<b>Figure 48</b> : Nombres de dendrites au sein des arbres apicaux et basaux des GC .....	156
<b>Figure 49</b> : Longueur totale et complexité des arbres dendritiques apicaux et basaux des GC .....	158
<b>Figure 50</b> : Exemple de marquage c-Fos sur une coupe de cerveau de souris après exposition odorante.....	162
<b>Figure 51</b> : Activation neuronale au sein du cortex piriforme suite à une exposition odorante .....	163
<b>Figure 52</b> : Comportement de flairage induit par l'odeur du PEA chez les souriceaux des groupes EQU, DEF et ENR.....	167
<b>Figure 53</b> : Données obtenues en EOG pour des stimulations du cornet III avec des concentrations croissantes de PEA – Groupes EQU, DEF et ENR .....	169
<b>Tableau 1</b> : Composition des régimes utilisés .....	88
<b>Tableau 2</b> : Composition du lait maternel à PND 10 .....	101
<b>Tableau 3</b> : Composition lipidique détaillée du lait maternel à PND 10 et des régimes utilisés .....	102
<b>Tableau 4</b> : Pourcentage d'individus répondants aux stimulations dans les trois groupes. 126	
<b>Tableau 5</b> : Séquences nucléotidiques des amorces utilisées en qPCR .....	129
<b>Tableau 6</b> : Composition lipidique des régimes maternels utilisés dans le projet n-3 .....	166

# Liste des annexes

---

<u>Annexe 1</u> : Manuscrit soumis au journal <i>Psychoneuroendocrinology</i> .....	219
<u>Annexe 2</u> : Liste des communications scientifiques.....	248
<u>Annexe 3</u> : Liste des enseignements.....	249

# Données Bibliographiques

# Préambule

---

« Car les hommes pouvaient fermer les yeux devant la grandeur, devant l'horreur, devant la beauté, et ils pouvaient ne pas prêter l'oreille à des mélodies ou à des paroles enjôleuses. Mais ils ne pouvaient se soustraire à l'odeur [...]. Qui maîtrisait les odeurs maîtrisait le cœur des hommes. » Patrick Süskind, Le Parfum.

Je ne m'étais jamais vraiment intéressée aux odeurs avant de commencer cette thèse. Pourtant, l'expérience quotidienne nous montre que les odeurs guident en permanence nos comportements. Notre hygiène corporelle en est un exemple, tout comme notre manière de nous alimenter. L'homme pense à tort être un « mauvais senteur », toutefois les œnologues et parfumeurs ont fait de leur nez l'outil principal de leur travail. Longtemps considéré comme un sens trivial et peu important, l'odorat s'avère être un sens unique en matière d'organisation anatomique et fonctionnelle, et très relié aux les circuits neuronaux de la prise alimentaire, de la mémoire, des émotions et des prises de décisions conscientes et non conscientes.

« *The womb may be more important than the home.* » D. Barker, British Medical Journal.

Il est aujourd'hui admis que l'alimentation des parents pendant la période de préconception, ainsi que l'alimentation maternelle pendant la grossesse et l'allaitement, influencent le développement d'un individu et affectent le fonctionnement de ses organes à long terme. La majeure partie de la population est désormais bien au fait des conséquences néfastes d'une alimentation riche en graisses et en sucres sur leur santé, mais les futurs parents doivent prendre conscience que leur alimentation engage également la santé de leur futur enfant.

# Partie 1 : L'alimentation maternelle

---

La grossesse constitue un véritable bouleversement physique et psychologique. Lorsqu'une personne de notre entourage attend un enfant, on lui dit souvent de se ménager, de ne pas faire trop d'efforts, afin d'établir un environnement optimal de développement pour le futur bébé. Une des recommandations classiques, c'est aussi de « bien manger ». Et l'on précise qu'il ne faut pas manger *comme* deux, mais *pour* deux. C'est donc ancré dans les esprits que la femme enceinte doit surveiller son alimentation, pour le bon développement de son petit. Quelles sont les bases scientifiques ayant fondé ces recommandations ?

## I. Les origines développementales de la santé et des maladies

Au début des années 90, Barker et collaborateurs ont émis l'hypothèse que de nombreuses pathologies chez l'adulte, comme le diabète, les maladies cardiovasculaires, les affections pulmonaires, les accidents vasculaires cérébraux, et certaines formes de cancer pouvaient avoir comme origine les conditions rencontrées dans l'environnement intra-utérin en plus du mode de vie, des habitudes alimentaires et des prédispositions génétiques (Barker 1990).

Ces maladies non transmissibles sont responsables de plus de 63% de la mortalité mondiale (WHO 2010), d'où l'enjeu scientifique de comprendre leurs causes afin de combattre ce fléau. Outre les prédispositions génétiques, le facteur de risque principal de contracter une maladie non transmissible est l'obésité ou le surpoids, causés par une balance énergétique positive (c'est-à-dire lorsque les apports caloriques sont supérieurs aux dépenses énergétiques). Malgré les campagnes de santé publique visant à promouvoir un mode de vie sain, en combinant une alimentation équilibrée avec une activité physique régulière, la moitié de la population mondiale est toujours actuellement obèse ou en surpoids (OMS 2018b). Il est donc nécessaire d'investiguer les mécanismes physiopathologiques qui sous-tendent le développement du surpoids et de l'obésité. Il apparaît aujourd'hui que les habitudes alimentaires et le mode de vie sédentaire d'un individu à l'âge adulte ne suffisent pas à expliquer ce déséquilibre de balance énergétique.

Ainsi, le concept des origines développementales de la santé et des maladies s'est développé et repose sur la notion de programmation foetale. Les tissus et organes foetaux s'adaptent à l'environnement nutritionnel précoce tout au long de leur développement (Barnes & Ozanne 2011). Chez les mammifères, le développement a lieu *in utero* et pendant la période

postnatale précoce. L'environnement intra-utérin est influencé par l'alimentation maternelle avant la conception et pendant la gestation. L'alimentation maternelle pendant la lactation détermine également la composition du lait maternel et donc les apports nutritionnels du nouveau-né. L'alimentation maternelle et l'état métabolique qui en résulte impactent donc la santé de la descendance en modifiant l'environnement nutritionnel pré- et postnatal.

### 1. L'environnement nutritionnel prénatal

Au cours du développement intra-utérin, le placenta assure le transfert des nutriments de la mère vers le fœtus et contribue à la croissance fœtale. Le placenta est sensible à l'alimentation maternelle et au statut métabolique de la mère et une dysfonction placentaire peut alors impacter la croissance et le développement du fœtus (Panchenko et al. 2015).

De plus, l'expression du matériel génétique apporté par les deux gamètes lors de la fécondation est modulée par les mécanismes épigénétiques. Ces mécanismes, qui comprennent la méthylation de l'ADN, les modifications post-traductionnelles des histones et l'implication des ARN non codants, contrôlent le niveau de condensation de la chromatine et l'accessibilité de l'ADN aux facteurs de transcription (Kouzarides 2007). Ainsi, l'expression des gènes peut être modifiée par des marques épigénétiques activatrices ou répressives qui sont dépendantes de l'environnement (Gabory et al. 2011). Au cours du développement intra-utérin, le fœtus subit une véritable reprogrammation épigénétique qui peut toucher les gènes clefs du développement, et ainsi affecter l'organogenèse et le fonctionnement des organes, ou modifier la régulation de l'expression de gènes importants pour le fonctionnement du tissu (Panchenko et al. 2015).

Ces deux mécanismes, l'un impliquant la fonction placentaire et l'autre les marques épigénétiques, influencent le développement fœtal et la santé à long terme en fonction des conditions nutritionnelles *in utero*.

#### *a) Notion d'environnement intra-utérin optimal*

Le poids de naissance a souvent été utilisé comme indice des conditions présentes *in utero* et relié à la mortalité des suites d'une maladie non transmissible à l'âge adulte. Un poids à la naissance trop faible ou trop élevé augmente les risques de développer un syndrome métabolique (Barnes & Ozanne 2011). En particulier, la relation entre le poids de naissance et la susceptibilité de développer un diabète de type 2 à l'âge adulte suit une courbe en

« U » (Harder et al. 2007). L'environnement intra-utérin jouant un rôle important dans le développement fœtal, une alimentation maternelle sub-optimale, qu'elle soit trop faible ou trop riche en calories, impacte négativement la santé métabolique de la descendance (Le Clair et al. 2009; Rooney & Ozanne 2011; Warner & Ozanne 2010; Yang & Huffman 2013). Ainsi, seul un environnement optimal permet au fœtus de se développer de manière à construire un organisme le moins vulnérable possible aux maladies non transmissibles.

*b) Restriction maternelle : l'hypothèse du phénotype prudent*

Les cas de restriction maternelle ont d'abord été étudiés sur des cohortes de femmes enceintes pendant les périodes de famine qui survenaient au cours des guerres. C'est notamment le cas des femmes enceintes pendant l'hiver hollandais, période de famine où l'apport calorique était de 400 à 800 Kcal par jour (Barnes & Ozanne 2011). Les enfants de ces femmes avaient un poids à la naissance plus faible, une diminution de la tolérance au glucose et un risque accru d'obésité, comparé à des individus né avant ou après la famine (Ravelli et al. 1998).

Ces associations épidémiologiques ont mené Hales et Barker à proposer l'hypothèse du phénotype prudent (Hales & Barker 2001). Cette théorie postule qu'une restriction calorique maternelle va entraîner une adaptation du fœtus pour augmenter ses chances de survie dans des conditions nutritionnelles pauvres. Selon cette théorie, si le fœtus est limité en nutriments, le développement des tissus particulièrement vitaux, comme le tissu cérébral ou cardiaque, sera privilégié aux dépens des autres organes tels que le pancréas exocrine, le foie et les reins (Barnes & Ozanne 2011). De plus, l'efficacité du métabolisme sera maximisée en ce qui concerne le stockage des nutriments, en induisant principalement une résistance à l'insuline (Barnes & Ozanne 2011). Ce phénotype prudent permettra alors à l'individu de survivre assez longtemps pour se reproduire dans un environnement nutritionnellement pauvre.

Les modifications structurelles et fonctionnelles des tissus fœtaux en développement se font sur la base d'une réponse adaptative prédictive (Gluckman & Hanson 2004) : elles ne confèrent pas d'avantage immédiat au fœtus, mais seraient responsables d'une meilleure adaptation au futur environnement dans lequel l'organisme vivra. Cette anticipation du futur environnement peut s'avérer bénéfique ou au contraire délétère si la prédiction ne concorde pas avec l'environnement réellement présent.

En effet, si l'environnement postnatal est nutritionnellement riche, l'organisme préparé à subsister dans un contexte de privation nutritionnelle sera mal adapté à son environnement et aura plus de chances de développer un syndrome métabolique (Gluckman & Hanson 2004).

Les bases biologiques de ces changements prédictifs sont avant tout des modifications épigénétiques de l'expression de gènes, ainsi que des modifications lors de la différenciation tissulaire affectant notamment le pancréas (Barnes & Ozanne 2011; Gluckman & Hanson 2004).

### *c) Obésité maternelle et alimentation riche en graisses et en sucres*

Actuellement dans les pays développés, les cas de restriction calorique se font plus rares que l'obésité maternelle, et l'alimentation maternelle riche en graisses et en sucre constitue un environnement nutritionnel néfaste pour le fœtus.

Le placenta fournit les nutriments provenant de la circulation maternelle et est capable de stocker l'énergie sous forme de lipides et de glycogène. Le placenta a une capacité considérable d'adaptation métabolique et peut jouer le rôle de « tampon » entre la circulation maternelle et le fœtus. Mais lorsque les limites de plasticité sont atteintes, le fœtus est exposé à l'environnement maternel néfaste, avec des conséquences sur sa prédisposition aux maladies à long terme (Godfrey 2002).

L'alimentation maternelle, l'obésité ou le diabète et les paramètres sanguins associés peuvent ainsi affecter l'histologie et la vascularisation du placenta et perturber la croissance fœtale (Panchenko et al. 2015). Plus précisément, la consommation d'aliments riches en graisse avant et pendant la gestation augmente le transport placentaire de glucose et d'acides aminés via une augmentation de l'expression de transporteurs spécifiques, contribuant ainsi à une croissance démesurée du fœtus (Jones et al. 2008).

Si le fœtus est exposé très tôt à un environnement de type obésogène, il accumulera des tissus graisseux et fera face à des taux élevés de glucose, qui seront à l'origine de perturbations métaboliques très précoces.

## 2. L'environnement nutritionnel postnatal

La période postnatale immédiate représente elle aussi une fenêtre de plasticité du développement, puisque les organes sont encore incomplets à la naissance et terminent de se former au cours de l'allaitement. L'environnement nutritionnel induit de nouveau des phénomènes de programmation métabolique impliqués dans la vulnérabilité de l'organisme à développer des désordres métaboliques à l'âge adulte (Patel & Srinivasan 2011).

### *a) Sous-nutrition postnatale*

La principale méthode pour étudier la sous-nutrition postnatale chez le rongeur consiste à comparer des portées larges à des portées standards. En augmentant le nombre de petits dans une portée, la compétition pour l'accès au lait maternel est plus importante et la quantité énergétique totale disponible pour chaque petit est réduite. Une telle sous-nutrition induit un retard de croissance, associé à une réduction de la signalisation de la leptine et de l'insuline (Patel & Srinivasan 2011).

### *b) Suralimentation postnatale*

A l'inverse, une suralimentation postnatale peut être obtenue en réduisant les portées, augmentant ainsi l'accessibilité au lait et l'ingestion de calories. Les petits développent alors un surpoids associé à des altérations métaboliques (hyperglycémie, hyperinsulinémie, hyperleptinémie) qui se maintiennent à l'âge adulte (Patel & Srinivasan 2011).

La suralimentation postnatale peut également provenir d'un lait maternel plus riche en calories. C'est le cas notamment lorsque la mère est nourrie avec une alimentation riche en graisses et en sucres. De nouveau, l'environnement obésogène est à l'origine du syndrome métabolique développé par les petits au cours de la lactation et qui persiste à l'âge adulte (Patel & Srinivasan 2011).

Par conséquent, l'alimentation maternelle est susceptible de modifier l'environnement nutritionnel périnatal, ce qui rend la progéniture plus vulnérable face au développement de pathologies à l'âge adulte.

Les habitudes alimentaires actuelles sont marquées par une ingestion importante de sucres et de graisses. Quelles conséquences sur la santé de la progéniture peuvent faire suite à une alimentation maternelle riche en graisses et en sucres ?

Nous nous focaliserons ici sur les conséquences en termes de santé métabolique et d'atteintes cérébrales.

## II. Alimentation maternelle et conséquences sur la santé métabolique de la progéniture

De nombreuses revues exposent les conséquences de l'obésité maternelle et de l'alimentation riche sur la santé métabolique de la progéniture, chez l'homme et dans les modèles rongeurs (Li et al. 2011; Nathanielsz et al. 2007; Rooney & Ozanne 2011; Williams et al. 2014).

Le syndrome métabolique peut être défini selon plusieurs critères. Généralement, il se caractérise par l'association d'au moins 3 affections parmi les suivantes : surpoids (indice de masse corporelle (IMC)  $> 25 \text{ kg/m}^2$ ) et périmètre abdominal élevé, hyperglycémie, hyperinsulinémie, hypercholestérolémie, hypertriglycéridémie et hypertension.

Nous présentons dans cette partie les données récoltées chez le rongeur concernant l'effet de l'obésité maternelle et de l'alimentation riche en graisses et en sucres sur les différents paramètres métaboliques utilisés pour caractériser le syndrome métabolique. Nous tenterons de rapporter les effets propres à l'alimentation maternelle indépendamment des conséquences de l'obésité maternelle, même si les deux impacts sont étroitement liés dans les cas d'obésité induite par l'alimentation maternelle.

Il n'existe pas de protocole standardisé chez le rongeur pour mettre en place une alimentation de type obésogène. Les souches d'animaux sont parfois différentes, les aliments utilisés peuvent contenir des teneurs très variables en macro- et micronutriments, être introduits à différents stades du développement et pendant des durées plus ou moins longues. Nous parlerons ici d'aliment gras et sucré (*high-fat high-sucrose*, HFHS) pour les aliments dont au moins 40 % de l'énergie est apportée par les lipides et contenant un apport en sucre simple, par rapport à des aliments standards dont l'apport lipidique correspond à environ 10 % de l'énergie totale et qui contiennent des sucres sous forme de glucides complexes uniquement.

## 1. Poids corporel et adiposité

Dans une méta-analyse de 171 articles scientifiques, Ribaroff et collaborateurs ont révélé une augmentation du poids de naissance chez les souris mâles provenant d'une mère exposée à l'aliment HFHS, mais une tendance à la baisse de poids pour les rats mâles (Ribaroff et al. 2017). Les mêmes tendances étaient observées chez les femelles, sans que les différences ne soient significatives. L'alimentation maternelle HFHS n'avait pas d'effet sur le poids de naissance des progénitures totales comprenant les mâles et les femelles.

En revanche, l'exposition maternelle à l'aliment HFHS augmentait significativement le poids de la progéniture au moment du sevrage ainsi que le poids et le degré d'adiposité à l'âge adulte, chez les mâles comme chez les femelles et ce pour les espèces de rats et de souris (Ribaroff et al. 2017). Chez les mâles uniquement, le surpoids au sevrage était corrélé à la proportion de glucides au sein de l'aliment HFHS. Chez les mâles et les femelles, l'exposition maternelle à l'aliment HFHS pendant la lactation était un prédicteur du surpoids (par rapport aux protocoles d'exposition pendant la gestation seulement).

L'augmentation du poids corporel chez la progéniture de femelles nourries à l'aliment HFHS provient d'un déséquilibre de la balance énergétique. Plusieurs phénomènes peuvent expliquer ce déséquilibre. Il a en particulier été montré qu'un excès de consommation d'aliments hautement énergétiques et palatables chez la mère pouvait modifier chez le fœtus et le nouveau-né l'activité des neurones régulant la prise alimentaire, la structure du système de la récompense, et exacerber le goût pour les aliments palatables, tout ceci contribuant à une augmentation de consommation d'aliments riches en calories (Bayol et al. 2007; Gugusheff et al. 2015; Muhlhausler & Ong 2011; Ong & Muhlhausler 2011).

## 2. Métabolisme glucidique et signalisation à l'insuline

Chez les rats comme les souris, l'alimentation maternelle HFHS entraîne une hyperglycémie chez les femelles seulement, mais les concentrations d'insuline sont plus élevées chez les mâles et les femelles, et ce uniquement lorsque les mères ont été exposées à l'aliment HFHS *a minima* pendant la lactation (Ribaroff et al. 2017).

Chez la souris, une baisse de sensibilité à l'insuline a également été rapportée chez la progéniture adulte de femelles exposées à l'aliment HFHS (Dunn & Bale 2009; Khalyfa et al. 2013; Masuyama & Hiramatsu 2014).

La perturbation du métabolisme glucidique et de la signalisation à l'insuline semble avoir pour origine une hypertrophie des îlots pancréatiques de Langerhans, dont les cellules  $\beta$  en

surnombre sont responsables de la production d'insuline (Gregorio et al. 2013). La résistance périphérique à l'insuline observée dans plusieurs modèles pourrait également être liée à un phénomène inflammatoire, marqué dès le stade fœtal par une infiltration de macrophages au sein des adipocytes hypertrophiés (Murabayashi et al. 2013), et par une augmentation dans l'expression adipocytaire de marqueurs pro-inflammatoires comme le facteur de nécrose tumorale  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) ou l'interleukine 6 (IL-6) chez le fœtus et l'adulte (Murabayashi et al. 2013; Yokomizo et al. 2014).

### 3. Profil lipidique sanguin

Les progénitures mâles et femelles des mères exposées à l'aliment HFHS présentent des taux élevés de cholestérol et de triglycérides sanguins, avec un effet plus prononcé chez les souris que chez les rats, et un effet plus fort lorsque les mères ont été nourries avec l'aliment HFHS pendant la gestation et la lactation que seulement pendant l'une des deux périodes (Ribaroff et al. 2017).

A l'origine de cette dyslipidémie, des modifications dans l'expression de gènes impliqués dans la biosynthèse des acides gras (AG) et dans l'homéostasie lipidique ont été identifiées dans le foie des petits au sevrage. Par exemple, certains gènes de la voie de signalisation des récepteurs activés par les proliférateurs de peroxyosomes étaient surexprimés chez la progéniture de femelles exposées à une alimentation HFHS (Ito et al. 2016; Zheng et al. 2014).

### 4. Signalisation à la leptine

Les taux de leptine ne constituent pas un critère définissant le syndrome métabolique. Cependant, la leptine est produite par le tissu adipeux et ses teneurs circulantes sont proportionnelles à la masse grasseuse. De plus, la leptine joue un rôle central dans le développement du surpoids et de l'obésité en agissant notamment sur les réseaux neuronaux de l'hypothalamus qui régulent le comportement alimentaire.

L'exposition maternelle à l'aliment HFHS augmente les taux de leptine circulante (Ribaroff et al. 2017). Chez le rat, une résistance à la leptine a été observée dès le jour postnatal (PND) 10 et qui est maintenue à l'âge adulte (Sun et al. 2012). Chez la souris, on observe une augmentation des taux d'ARNm codant pour la leptine et une diminution des taux d'ARNm codant pour son récepteur dans le tissu adipeux, qui ont pour origine une différence de

méthylation dans les régions promotrices de leurs gènes (Khalyfa et al. 2013; Masuyama & Hiramatsu 2014), perturbant ainsi la signalisation de la leptine.

Ainsi de manière générale, l'exposition maternelle à une alimentation HFHS induit un surpoids au sevrage qui persiste à l'âge adulte chez la progéniture, associé à une augmentation du degré d'adiposité, des taux lipidiques sanguins et à une hyperinsulinémie. On peut néanmoins souligner que certaines études chez la souris relèvent très peu d'anomalies métaboliques chez la progéniture des femelles nourries à l'aliment HFHS (Chin et al. 2017; Platt et al. 2014).

Cependant et de manière assez surprenante, les proportions lipidiques des aliments HFHS ne semblent pas corrélées à la fréquence des anomalies métaboliques de la progéniture (Ribaroff et al. 2017). Les effets métaboliques de l'alimentation maternelle HFHS sur la progéniture pourraient alors provenir des perturbations métaboliques maternelles (poids gestationnel, homéostasie glucidique pendant la gestation et la lactation, régulations endocrines) induites par l'excès de graisses ingérées plutôt que de l'alimentation maternelle en elle-même.

Chez le rongeur, les différentes études ont tendance à identifier la lactation comme étant la période critique pendant laquelle l'exposition maternelle à l'aliment HFHS impacte le plus négativement la physiologie métabolique de la progéniture (Mitra et al. 2008; Oben et al. 2010; Ribaroff et al. 2017; Sun et al. 2012). Une exposition maternelle à l'aliment HFHS pendant la gestation seulement peut tout de même entraîner des anomalies métaboliques chez la progéniture (Williams et al. 2014).

Cet impact métabolique de l'obésité et de l'alimentation maternelle HFHS prédispose la progéniture à développer un syndrome métabolique.

On place souvent le cerveau en tête de liste des organes vitaux de notre organisme. Véritable poste de commande des fonctions autonomes et siège des processus sensoriels et cognitifs, le cerveau contient deux types cellulaires principaux : les neurones et les cellules gliales. Ces cellules se mettent en place au sein du tissu cérébral dès les stades embryonnaires précoces, et de nombreux travaux se sont intéressés à l'impact de l'obésité et de l'alimentation maternelle HFHS sur le développement et le fonctionnement du cerveau chez la progéniture.

### III. Alimentation maternelle et atteintes cérébrales chez la progéniture

Plusieurs revues mettent en lumière l'impact de l'obésité maternelle et de la consommation d'aliments HFHS pendant les périodes périnatales sur les fonctions cognitives, la santé mentale et les risques de développer des désordres neuropsychiatriques chez la progéniture, à partir d'études menées chez l'homme et chez l'animal (Contu & Hawkes 2017; Edlow 2017; Rivera et al. 2015; Sullivan et al. 2014; Sullivan et al. 2015). Les petits nés d'une mère ayant consommé un excès de graisses et de sucres pendant le développement fœtal et postnatal peuvent également présenter des perturbations dans les circuits neuronaux qui régulent la prise alimentaire et les comportements motivés, ce qui impacte les préférences et le comportement alimentaires de l'adulte (Muhlhausler & Ong 2011).

Nous nous intéressons dans cette partie aux altérations cellulaires et tissulaires induites par l'alimentation maternelle HFHS dans différentes régions cérébrales chez la progéniture des modèles rongeurs, et qui sous-tendent les perturbations comportementales d'origine neuropsychiatrique.

#### 1. Neuro-inflammation

L'alimentation HFHS pendant la gestation perturbe la morphologie du placenta, qui devient le siège d'une inflammation marquée par la production élevée de cytokines pro-inflammatoires et par l'activation des macrophages (Kim et al. 2014; Saben et al. 2014a).

Une augmentation des marqueurs d'inflammation a été rapportée dans le cerveau de fœtus, de jeunes individus et d'adultes provenant d'une mère ayant consommé de l'aliment HFHS pendant la gestation (Bilbo & Tsang 2010; Kang et al. 2014; Rother et al. 2012). En particulier, les marqueurs d'activation microgliale et les cytokines pro-inflammatoires présents en quantités étaient associés à un comportement anxieux ou hyperactif chez l'animal adulte (Bilbo & Tsang 2010; Kang et al. 2014). Les régions cérébrales touchées par l'inflammation comprennent l'hippocampe (Bilbo & Tsang 2010) et l'hypothalamus (Rother et al. 2012). L'exposition néonatale à des taux élevés de cytokines pro-inflammatoires impacte le développement neuronal des systèmes à sérotonine, à dopamine et à mélanocortine (Das 2001), ainsi que la prolifération astrocytaire au sein de l'hypothalamus (Kim et al. 2016), ce qui peut expliquer certaines altérations comportementales chez la progéniture de mères exposées à l'alimentation HFHS.

Chez les mères sous alimentation HFHS, le placenta est également soumis à un stress oxydatif important, marqué par la production élevée d'espèces réactives de l'oxygène (Saben

et al. 2014a). Ces composés réagissent avec les lipides qui s'accumulent alors sous forme peroxydée, induisant une instabilité synaptique due à une perte d'épines dendritiques sur les neurones pyramidaux du cortex cérébral (Hatanaka et al. 2016), et altérant en particulier la neurogenèse adulte au sein de l'hippocampe, à l'origine de déficits dans l'apprentissage spatial (Tozuka et al. 2009; Tozuka et al. 2010).

## 2. Prolifération, différenciation neuronale et projections axonales

Chez les fœtus provenant de mères exposées à l'aliment HFHS, l'expression des gènes impliqués dans la régulation du cycle cellulaire, de la prolifération et de l'apoptose est modifiée (Edlow et al. 2016). Par conséquent, la prolifération des précurseurs neuronaux est altérée au sein du gyrus denté de l'hippocampe, qui présente également des taux d'apoptose et de différenciation neuronale diminués (Niculescu & Lupu 2009). Ces données expliqueraient les déficits mnésiques observés à l'âge adulte chez la progéniture de femelles soumises à l'aliment HFHS.

Des modifications dans la prolifération et dans la maturation neuronale ont également été rapportées au niveau de la région hypothalamique fœtale. Le nombre de neurones exprimant le neuropeptide Y (NPY) et le peptide « *agouti-related* » (AgRP) (tonus orexigène) était plus élevé, tandis que le nombre de neurones exprimant l'hormone mélanotrope  $\alpha$ -MSH (tonus anorexigène) était plus faible dans le cerveau des fœtus (Stachowiak et al. 2013). Une augmentation dans la prolifération des précurseurs neuronaux du neuroépithélium hypothalamique est également responsable de l'expression accrue de cinq autres peptides orexigènes chez le nouveau-né (Chang et al. 2008).

De plus, l'alimentation maternelle HFHS pendant la lactation exclusivement provoque une hyperinsulinémie néonatale qui réduit les projections axonales des neurones exprimant la pro-opiomélanocortine (POMC) et l'AgRP au sein des sites intra-hypothalamiques (Vogt et al. 2014).

Ce remodelage précoce des circuits neuronaux hypothalamiques, induit par une alimentation maternelle HFHS, pourrait constituer un mécanisme sous-jacent au développement du surpoids d'un individu à travers une augmentation de son appétit (Muhlhausler & Ong 2011). L'alimentation maternelle HFHS induit un contexte inflammatoire lors du développement fœtal, et des taux élevés de cytokines pro-inflammatoires sont associés à une diminution de la densité axonale au sein des fibres sérotoninergiques (Ishikawa et al. 2007) et à une survie des neurones embryonnaires à sérotonine et à dopamine réduite (Jarskog et al. 1997). Or, la sérotonine joue un rôle prépondérant dans les phénomènes de migration neuronale, de

neurogenèse corticale et de synaptogenèse au cours du développement cérébral foetal (Daws & Gould 2011; Kannan et al. 2011). La dopamine est quant à elle impliquée dans la régulation du comportement alimentaire motivé associé aux mécanismes de récompense (Berridge 1996). Ainsi, des modèles animaux d'exposition maternelle à l'aliment HFHS ont révélé des perturbations de signalisations sérotoninergique et dopaminergique associées à des déficits neurocomportementaux chez la progéniture (hyperactivité, comportement anxieux et dépressif, troubles alimentaires et addictifs) (Rivera et al. 2015; Sullivan et al. 2015).

### 3. Morphologie dendritique

Les dendrites constituent des prolongements du corps cellulaire des neurones impliqués dans le traitement des informations nerveuses. Le remodelage des dendrites et des épines dendritiques joue un rôle particulièrement important dans la mémoire (Bailey & Kandel 1993; Maletic-Savatic et al. 1999; Yang et al. 2008). L'exposition maternelle à une alimentation HFHS réduit la complexité dendritique des neurones de l'hippocampe (Janthakhin et al. 2017; Tozuka et al. 2010), de l'amygdale (Janthakhin et al. 2017), et du cortex préfrontal médian (Rincel et al. 2017). Les altérations dendritiques observées comprenaient une longueur totale de l'arbre dendritique plus courte dans le cortex préfrontal et l'hippocampe des individus juvéniles, associée à une réduction du nombre de prolongements dendritiques et à une baisse de la densité des épines dendritiques (Rincel et al. 2017; Tozuka et al. 2010). Chez l'animal adulte, seule une atrophie de l'arbre dendritique basal des neurones de l'hippocampe et de l'amygdale a été retrouvée (Janthakhin et al. 2017).

Ces phénomènes pourraient provenir d'une augmentation de la peroxydation lipidique et d'une altération de la production du facteur neurotrophique dérivé du cerveau (BDNF) (Tozuka et al. 2010). Le BDNF est en effet un modulateur clef du fonctionnement synaptique qui influence la plasticité, la mise en place et le renouvellement des synapses (Lu et al. 2013), ce qui pourrait alors affecter la densité des épines dendritiques. Compte tenu du rôle neuro-développemental de la leptine, qui peut agir comme un facteur neurotrophique pour promouvoir la neurogenèse, la croissance axonale, la plasticité synaptique et la morphologie dendritique (Bouret 2010b), des taux élevés de leptine pourraient également expliquer les remodelages dendritiques observés chez la progéniture de mères exposées à l'aliment HFHS. Au niveau comportemental, ces altérations dendritiques compromettent l'apprentissage spatial (Tozuka et al. 2010) et la mémorisation d'une aversion olfactive (Janthakhin et al. 2017; Rincel et al. 2017).

Bien que les études se soient jusqu'à présent focalisées sur l'hippocampe et l'hypothalamus, l'alimentation maternelle HFHS pendant les périodes de développement est susceptible d'impacter l'anatomie et le fonctionnement de chaque structure cérébrale au sein du système nerveux central dans son ensemble.

Cependant, l'impact de l'alimentation maternelle sur les systèmes sensoriels reste peu étudié.

Le goût est un déterminant majeur de la prise alimentaire. Différentes saveurs sont transmises depuis l'alimentation maternelle au fœtus (via un transfert placentaire au sein du liquide amniotique) et au nouveau-né (via le lait maternel) et influencent la gustation et les préférences alimentaires du jeune individu et de l'adulte (Mennella et al. 2001; Mennella 2009; Mennella et al. 1995). Chez le rat et le lapin, les individus adultes ont montré une préférence pour les saveurs présentes dans l'alimentation de leur mère (Bilkó et al. 1994; Galef & Henderson 1972). L'exposition à une saveur spécifique pendant le développement intra-utérin ou postnatal semble initier son association avec un aliment consommé par la mère, qui a donc une valeur présumée sûre et nutritive (Mennella 2009). Il existe par ailleurs dans la sphère orale des récepteurs spécialisés dans la détection sensorielle du gras (Gaillard et al. 2008), et les individus présentant un seuil de détection du gras plus élevé auraient tendance à consommer plus de graisses au sein de leur alimentation (Stewart et al. 2010). Ainsi, les individus exposés de manière très précoce au gras développeraient une attirance pour les aliments gras à cause d'une désensibilisation des récepteurs oraux détectant le gras (Muhlhausler & Ong 2011).

De la même manière, le fœtus est sensible aux odeurs présentes *in utero* et dans le lait maternel (Marlier et al. 1998; Schaal et al. 2000). Chez le rongeur, les odeurs ainsi rencontrées pendant les périodes précoces du développement peuvent induire des préférences envers ces odeurs après le sevrage (Coureaud et al. 2002; Todrank et al. 2011).

Ainsi, l'odorat des petits semble être influencé par l'alimentation de la mère pendant les périodes de développement fœtal et postnatal. Nous nous proposons dans cette thèse d'apporter des éléments de réponse quant aux conséquences d'une alimentation maternelle HFHS sur l'olfaction de la progéniture.

Pourquoi étudier la modalité sensorielle olfactive ? Le chapitre suivant expose l'importance des odeurs pour un individu et décrit le fonctionnement du système olfactif.

## Partie 2 : Bases anatomiques et fonctionnelles de l'olfaction

---

Les animaux possèdent des systèmes sensoriels leur permettant de percevoir le monde autour d'eux. Cette appréciation du milieu extérieur est essentielle pour une adaptation aux conditions de vie. Ainsi, les sens sont innés mais soumis à un développement, un perfectionnement en relation avec les éléments de l'environnement.

Les systèmes sensoriels permettent non seulement de détecter des changements dans les conditions environnementales, mais aussi des signaux internes à l'organisme. Ainsi, ils guident des comportements pour assurer la survie basique de l'individu et participent au maintien de l'homéostasie de l'organisme.

Il est généralement admis que l'homme possède cinq sens : la vision, l'ouïe, l'odorat, le goût et le toucher ; auxquels peuvent s'ajouter d'autres perceptions plus ou moins développées (sens de l'équilibre, proprioception, thermoception, nociception).

La présente thèse s'intéresse à l'odorat, ou olfaction. L'homme s'appuie beaucoup sur la vue pour appréhender son environnement, et le rôle des odeurs est bien souvent sous-estimé au sein de la population générale. Pourtant, au moins 5 % de la population présenterait des dysfonctions olfactives ([Landis et al. 2004](#); [Wysocki & Gilbert 1989](#)), avec pour conséquence une détérioration de la qualité de vie ([Frasnelli & Hummel 2005](#); [Hummel & Nordin 2005](#)). Des situations du quotidien nous montrent que les odeurs ont une véritable influence comportementale. Sentir l'odeur des croissants apportés par un collègue à 10h nous incitera peut-être à faire une pause gourmande. En revanche, lorsque l'odorat est compromis à cause d'un rhume par exemple, s'alimenter n'est plus aussi plaisant que d'habitude. Sentir une odeur de gaz dans son appartement nous incitera généralement à vérifier les conduits et ouvrir les fenêtres. Pour calmer un enfant qui pleure, on lui donne son doudou préféré, celui à l'hygiène douteuse mais qui porte une odeur caractéristique.

Avant de décrire l'organisation et le fonctionnement du système à l'origine de la perception des odeurs, il me semble donc nécessaire de préciser l'importance de l'olfaction pour un individu.

## I. Rôle et importance des odeurs

L'olfaction est un sens primordial pour de nombreuses espèces. La capacité d'identification et de discrimination des odeurs est utile voir nécessaire pour les activités de recherche de nourriture, d'évitement des prédateurs et des dangers, d'identification de partenaires pour la reproduction. Ces comportements guidés par l'olfaction permettent donc la survie de l'animal et la pérennité de l'espèce. L'homme ne déroge pas quant aux rôles et à l'importance des odeurs. L'espèce humaine présente d'ailleurs des capacités olfactives bien supérieures aux croyances communes qui placent l'odorat au second plan par rapport aux autres sens et qui définissent l'homme comme un « mauvais senteur » (McGann 2017).

### 1. Définition d'une odeur

Une odeur est une perception sensorielle déclenchée par la détection d'une ou plusieurs molécules odorantes. Les odeurs constituent des signaux complexes formés le plus souvent par des mélanges d'odorants plutôt que par des molécules seules. Pour qu'une molécule chimique soit détectée, à l'origine de la perception d'une odeur, elle doit être volatile. Les molécules odorantes sont très diverses en termes de structure chimique et de configuration tri-dimensionnelle. Le système olfactif est donc un système de détection chimique à large spectre, dont les limites ne sont pas clairement définies. L'homme serait capable de détecter et discriminer au moins 1 milliard de milliards ( $10^{18}$ ) d'odeurs (Bushdid et al. 2014).

On parle de phéromones pour les molécules chimiques produites par une espèce animale donnée et qui déclenchent des comportements spécifiques chez les individus de cette même espèce. Ces signaux olfactifs spécifiques d'une espèce permettent aux individus de discerner le sexe, l'âge, le statut social, l'état reproductif et l'état de santé de leurs congénères.

### 2. Olfaction et relations sociales

Chez l'animal, les interactions sociales reposent beaucoup sur l'olfaction. L'urine des mammifères est une source importante d'odeurs biologiques, portées en particulier par des amines biogènes, qui renseignent sur l'identité et l'état interne de l'individu. Par exemple chez le rongeur, les teneurs urinaires en 2-phenylethylamine sont plus élevées chez des animaux stressés (Snoddy et al. 1985) ; et l'urine des mâles contient plus d'isoamylamine et de triméthylamine que l'urine des femelles (Gavaghan McKee et al. 2006).

La fonction de reproduction est essentielle pour assurer la pérennité de l'espèce. Chez différents mammifères, plusieurs composés chimiques identifiés dans l'urine de mâles peuvent accélérer la puberté des femelles et induire l'œstrus (Ferrero & Liberles 2010).

La reconnaissance des individus apparentés est également possible grâce aux odeurs associées au complexe majeur d'histocompatibilité (Brennan & Kendrick 2006). Ainsi, les individus utilisent ces indices odorants pour marquer leur territoire et défendre leurs ressources vis-à-vis des individus étrangers. Des composés volatils de l'urine de mâles adultes ont également été identifiés comme étant déclencheurs du comportement d'agressivité inter-mâles (Novotny et al. 1985).

Les femelles sont quant à elles capables de reconnaître l'odeur de leurs petits, qui deviennent des indices odorants attractifs indispensables pour l'établissement du comportement maternel (Corona & Lévy 2015). La survie des petits dépend entièrement de leur mère, qui doit les nourrir, les abriter, les réchauffer, et les protéger d'éventuels prédateurs, jusqu'à ce qu'ils deviennent autonomes à la fin de leur développement. La maternité augmente la complexité dendritique au sein du bulbe olfactif, ce qui améliore la mémoire olfactive et permet une attention maternelle particulière (Belnoue et al. 2016). Lors d'un stress gestationnel « physique » (par contention dans des cylindres transparents sous une lumière vive), la plasticité bulbaire n'est pas augmentée, et les interactions mère-petits sont compromises (Belnoue et al. 2016). L'exposition à une alimentation grasse avant et pendant la gestation constitue également un stress qui diminue l'activité neuronale dans le bulbe et contribue au comportement maternel inapproprié (Bellisario et al. 2015).

### 3. Les odeurs permettent de détecter des dangers

On peut considérer le système olfactif comme un système d'alerte permettant d'éviter les situations qui menacent la survie. Certaines odeurs sont caractéristiques de situations dangereuses et provoquent des réactions stéréotypées. C'est cas par exemple de l'odeur du brûlé et du gaz, qui incitent à la fuite.

Les souris utilisent également des sous-structures du système olfactif pour détecter les environnements pauvres en oxygène (Bleymehl et al. 2016), et évitent le dioxyde de carbone (Hu et al. 2007), ce qui leur permet d'éviter l'asphyxie.

A ces dangers physiques s'ajoute une autre situation menaçant directement la survie : l'ingestion de nourriture avariée. Chez l'homme, le mouvement de retrait est naturel lorsque l'on sent un yaourt périmé ou de la viande avariée. Les souris sont capables de détecter des

molécules spécifiques telles que le pentanal et l'acide 2-méthylbutyrique qui leur permettent d'éviter les aliments avariés de manière innée (Kobayakawa et al. 2007).

Enfin, un danger principal pour les animaux réside dans la présence de prédateurs. Si les animaux sont capables de suivre la piste olfactive d'une proie sur des kilomètres, ils peuvent également reconnaître les signaux odorants caractéristiques de leurs prédateurs. Chez la souris, l'exemple le mieux décrit est l'aversion et la réaction de peur induits par la molécule de 2,5-dihydro-2,4,5-trimethylthiazoline (TMT), produite par le renard (Rosen et al. 2015). La réponse comportementale des souris à la TMT est tellement innée et stéréotypée que cette molécule est largement utilisée dans les procédures expérimentales qui visent à induire un stress ou un comportement de tétanie (*freezing*) chez la souris.

Si les individus sont capables de détecter les odeurs de leurs prédateurs pour tenter de les éviter, les femelles voient également leur comportement reproductif et maternel influencé par l'expérience olfactive antérieure des mâles. Chez le rat, Korgan et collaborateurs ont montré que les femelles présentaient significativement moins d'intérêt pour des mâles préalablement exposés quotidiennement pendant une semaine à une odeur de prédateur (morceaux de colliers portés par des chats) que pour des mâles exposés à une odeur contrôle (morceaux de colliers propres) (Korgan et al. 2016). De plus, les femelles mises en reproduction avec des mâles ainsi exposés à l'odeur de prédateurs exerçaient un comportement de toilettage et d'allaitement des petits plus prononcé que les femelles mises en reproduction avec des mâles non exposés à l'odeur de prédateur en conditions d'hébergement semi-naturaliste (Korgan et al. 2016). Enfin, la progéniture juvénile de ces femelles accouplées avec les mâles pré-exposés à l'odeur de prédateur montrait un comportement d'évitement diminué lors des jeux naturels d'attaques par les congénères (Korgan et al. 2016). Ainsi, l'expérience odorante des mâles influencerait chez les femelles les préférences dans le choix des partenaires et le comportement maternel, et chez les petits les réactions de défense, sans que ni les femelles ni les petits n'aient été en contact avec les odeurs rencontrées par les mâles avant la reproduction.

#### 4. Odeurs et comportement alimentaire

Les animaux, y compris les hommes, apprennent à s'alimenter en réponse aux caractéristiques sensorielles, en faisant des associations entre l'expérience sensorielle précoce et les effets post-ingestifs. La prise alimentaire repose sur l'interaction entre les besoins homéostatiques de l'organisme et les sensations hédoniques. Ainsi, le comportement

alimentaire est complexe et peut être décomposé en trois étapes principales, toutes trois influencées par l'olfaction.

#### *a) Initiation de la prise alimentaire*

Pour initier la prise alimentaire, il est nécessaire de rechercher et localiser la nourriture, puis de sélectionner les aliments et enfin de commencer à les ingérer.

##### ➤ Recherche et localisation de la nourriture

De nombreux mammifères, y compris le lapin et les rongeurs, naissent aveugles et doivent donc obligatoirement utiliser les indices olfactifs produits par les mamelles de leur mère pour s'alimenter (Blass & Teicher 1980). Le 2-méthyl-2-butenal est un composé chimique que l'on trouve dans le lait maternel de la lapine et qui déclenche chez le nouveau-né un comportement inné de tétée (Schaal et al. 2003). Cette molécule n'a été retrouvée dans aucun autre fluide biologique, ni chez une autre espèce que le lapin, ce qui suggère que chaque espèce produirait un composé spécifique pour induire le réflexe de tétée chez les nouveau-nés. Ainsi, chez le lapin, la localisation de la source de nourriture du nouveau-né dépend entièrement de l'olfaction. Les tentatives d'identification d'une telle phéromone chez le rongeur sont à ce jour restées vaines.

Chez l'adulte, la recherche de nourriture est une activité parfois compliquée dans le milieu naturel, où les sources alimentaires peuvent être rares et cachées. Les odeurs alimentaires peuvent alors signaler la présence d'aliments comestibles à proximité avant même qu'ils soient identifiés visuellement (Stevenson 2010).

##### ➤ Sélection des aliments

Les odeurs alimentaires peuvent attirer l'attention vers des sources de nourriture, mais pourraient également aider à la prévision des nutriments et de l'énergie apportés par les aliments à disposition. Le mélange de molécules volatiles chimiques qui s'en dégagent varie notamment en fonction de leur état de dégradation ou de maturité. L'anticipation des propriétés nutritionnelles permettrait à l'organisme en condition de satiété de consommer préférentiellement les aliments capables de restaurer les stocks de glucose, et ces aliments

seraient évalués palatables sur la base de leurs propriétés oro-sensorielles (Le Magnen 2001).

Plus récemment, il a été montré que l'exposition inconsciente aux odeurs pouvait influencer les décisions alimentaires. Par exemple, la présence non consciemment détectée d'une odeur de fruit avant un repas a orienté les choix des participants vers des aliments à base de fruits et légumes (Gaillet-Torrent et al. 2014).

La sélection des aliments consiste à choisir ceux qui seront ingérés et à mettre de côté les aliments à éviter. Comme mentionné dans le paragraphe précédent, l'évitement de la nourriture avariée est possible grâce à l'olfaction. De plus, si l'animal a un doute face à un aliment présent devant lui, il va d'abord le renifler et éventuellement sentir les congénères qui ont consommé cet aliment avant de décider de l'ingérer ou non (Stevenson 2010). Ainsi, la néophobie alimentaire existe chez le rongeur et chez l'homme.

D'autres aliments seront également spontanément évités, ce sont les aliments dits aversifs. L'aversion alimentaire est la mémoire à long terme d'une expérience acquise suite à une association unique entre l'ingestion d'un aliment et un désagrément survenu juste après, et l'aversion alimentaire a une forte composante olfactive (Capaldi et al. 2004).

#### ➤ Ingestion de la nourriture

Une fois les aliments sélectionnés, l'initiation de la prise alimentaire est effective lors de l'ingestion de nourriture. Celle-ci est favorisée par l'état de faim de l'organisme, qui provoque des réactions nécessaires à la préparation de l'entrée des aliments dans le système digestif, et les odeurs agissent sur ces réactions physiologiques.

Chez l'homme, certains individus anosmiques ont rapporté une altération de leur qualité de vie qui était en partie due à une baisse de leur appétit et/ou de leur poids corporel (Bonfils et al. 2005). La perte de perception odorante entraînerait alors une perte d'intérêt pour les aliments. Mais chez d'autres individus anosmiques également, on observe une prise de poids qui pourrait être expliquée par un détournement des préférences alimentaires vers les aliments très palatables du point de vue gustatif (sucre, gras) en réponse à la perte d'odorat (Stevenson 2010). Ainsi chez l'homme, les conséquences de l'anosmie sur l'ingestion de nourriture sont très contradictoires et dépendent des réactions individuelles.

Chez des individus normosmiques, il a été montré que l'exposition à des odeurs alimentaires très plaisantes (pizza, gâteau) peut stimuler la salivation, augmenter l'appétit et l'intention de consommation (Engelen et al. 2003; Ferriday & Brunstrom 2011), promouvant ainsi l'ingestion de nourriture.

Les indices visuels et odorants lors de la présentation d'un repas sans son ingestion, participent également à l'augmentation pré-prandiale d'insuline (Johnson & Wildman 1983), dans le but de préparer l'organisme à l'arrivée nutriments qu'il faudra transformer, transporter, utiliser et stocker.

Chez l'animal, il a également été montré que les odeurs alimentaires participent à la phase céphalique de sécrétion de l'insuline, qui constitue un état physiologique initiant la prise alimentaire (Le Magnen 2001).

De plus, les odeurs alimentaires seraient capables de moduler l'activité des neurones régulateurs de la prise alimentaire au sein du noyau arqué de l'hypothalamus. Chen et collaborateurs ont montré chez l'animal vigile que la présence de nourriture sans son ingestion était suffisante pour modifier les taux d'activation des neurones à AgRP et POMC (Chen et al. 2016). Cet effet était immédiatement réversé en enlevant la nourriture, et l'intensité de réponse des neurones dépendait de la palatabilité de la nourriture présentée.

Les auteurs suggèrent qu'il y aurait au niveau du noyau arqué une association entre la stimulation sensorielle et la valeur plaisante et/ou énergétique de l'aliment. Ainsi, le noyau arqué serait informé en temps réel de la disponibilité en nourriture et de sa palatabilité. Cette régulation sensorielle serait rapide et anticipatoire : avant même d'avoir ingéré la nourriture, l'activité des neurones favorisant la prise alimentaire était diminuée. Ce processus permettrait d'initier la transition entre le comportement de recherche de nourriture et la prise alimentaire en elle-même. En effet, l'activation des neurones AgRP favorisent la prise alimentaire et la motivation pour chercher de la nourriture. La régulation sensorielle anticipatoire serait un moyen de stopper la recherche de nourriture lorsque des aliments sont déjà à disposition et d'initier l'ingestion de nourriture.

#### *b) Maintien de la prise alimentaire*

Une fois l'ingestion de nourriture initiée, la prise alimentaire est maintenue sous deux conditions. Premièrement, la prise alimentaire est maintenue si l'état de satiété n'est pas atteint. Deuxièmement, l'ingestion de nourriture sera maintenue tant que le plaisir alimentaire sera présent. La prise alimentaire repose en effet sur deux composantes : une

composante physiologique, qui vise à restaurer les stocks énergétiques de l'organisme, et une composante hédonique, qui vise à satisfaire l'organisme et à assurer un sentiment de plénitude. Cette composante hédonique dépend fortement du système de la récompense qui reçoit des afférences sensorielles gustatives et olfactives (Riera & Dillin 2016) (Figure 1). L'information olfactive pourrait atteindre le système de la récompense via le tubercule olfactif, structure comprise dans le cortex olfactif et qui fait partie intégrante de ce système de la récompense (Wesson & Wilson 2011).

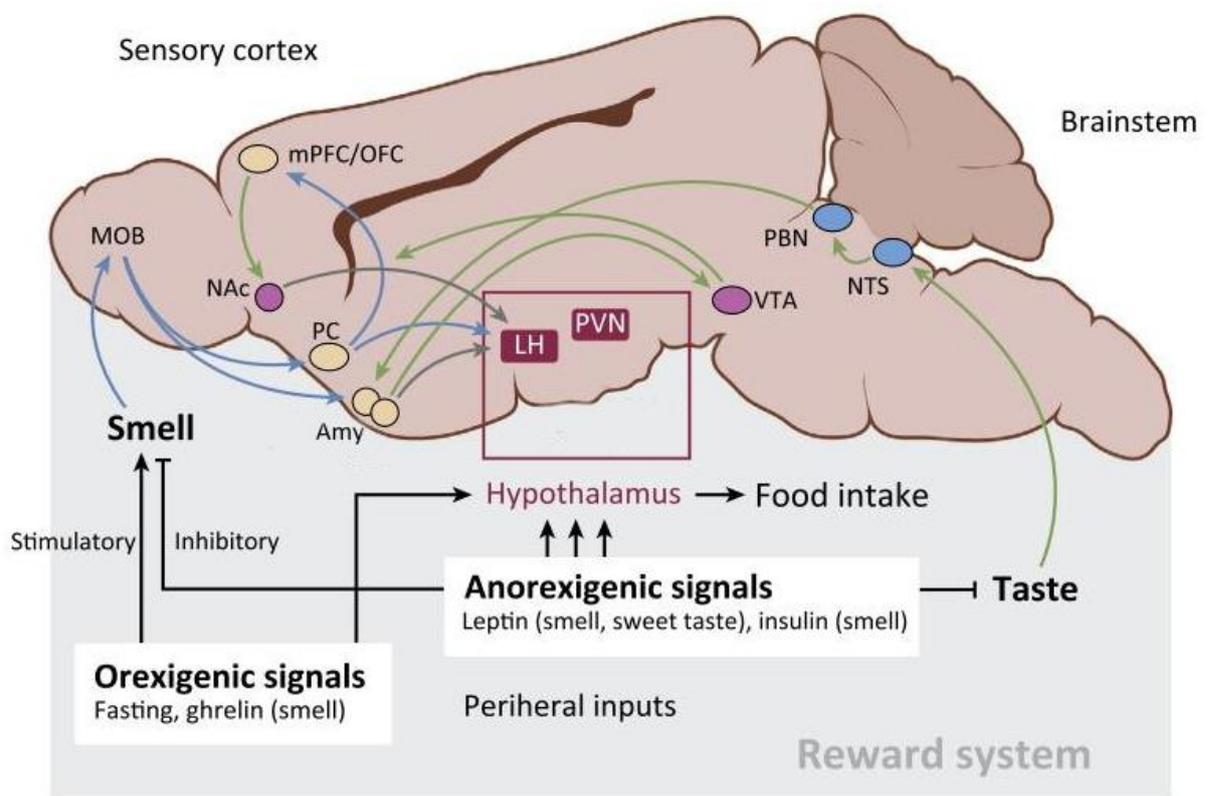


Figure 1 : Modèle intégré des afférences sensorielles au niveau du système nerveux central régulant l'homéostasie énergétique et la prise alimentaire hédonique

Les signaux gustatifs sont représentés en vert et les signaux olfactifs en bleu. L'amygdale (Amy) reçoit des informations sensorielles olfactives directes provenant du bulbe olfactif (MOB) et du cortex piriforme (PC), et gustatives indirectes via le noyau du tractus solitaire (NTS) et le noyau parabrachial (PBN). L'amygdale active le système mésolimbique dopaminergique (système de la récompense), composé de l'aire tegmentale ventrale (VTA), du noyau accumbens (NAc), du cortex préfrontal médian (mPFC) et du cortex orbitofrontal (OFC). Ce système de la récompense va ensuite activer l'hypothalamus latéral (LH), où les afférences GABAergiques vont promouvoir la prise alimentaire en stimulant le noyau paraventriculaire (PVN). D'après Riera & Dillin 2016.

L'olfaction est donc une des modalités sensorielles majeures (avec le goût) contribuant au plaisir alimentaire et à la palatabilité du repas. Les aliments ne sont pas palatables uniquement de manière innée, la palatabilité peut être apprise par des phénomènes d'association et de renforcement par les effets post-ingestifs des aliments et les conséquences métaboliques associées (Le Magnen 2001). Ainsi, l'expérience antérieure d'une flaveur et les conséquences satiétogènes associées déterminent en partie la quantité consommée d'un aliment (Stevenson 2010) et participent à la détermination de la taille d'un repas.

### *c) Arrêt de la prise alimentaire*

L'ingestion de nourriture s'arrête donc lorsque l'organisme est rassasié et/ou lorsque le plaisir alimentaire disparaît.

Le phénomène de rassasiement sensoriel spécifique fait référence à la diminution du plaisir ressenti pour un aliment après l'avoir mangé jusqu'au rassasiement, et à la diminution de la quantité de cet aliment par rapport à d'autres aliments ingérés par la suite (Rolls & Rolls 1997). L'implication des odeurs dans ce phénomène a été mise en évidence pour la première fois chez le rat dans les années 1950 par Le Magnen (Le Magnen 2001). En utilisant un même aliment standard associé à différentes odeurs, les auteurs ont montré que la présentation successive de l'aliment différemment odorisé induisait une augmentation de l'ingestion à chaque fois qu'un nouvel odorant apparaissait au sein d'un repas unique.

Pour aller plus loin, une région du cortex orbitofrontal (OFC) a été identifiée comme support possible au phénomène de rassasiement sensoriel spécifique médié par l'olfaction (O'Doherty et al. 2000). Cette étude, menée par imagerie par résonance magnétique (IRM) fonctionnelle chez l'homme, a révélé que le degré d'activation de cette structure au sein de l'OFC diminuait lors d'une exposition à une odeur d'aliment consommé jusqu'au rassasiement, alors qu'aucune diminution n'était observée lors d'une exposition à une odeur d'aliment non consommé (O'Doherty et al. 2000).

En participant au rassasiement sensoriel spécifique, les odeurs diminuent donc le plaisir alimentaire pour les aliments déjà consommés, ce qui initie l'arrêt de la prise alimentaire.

Enfin, les odeurs alimentaires jugées plaisantes en état de faim peuvent devenir déplaisantes en condition de satiété. Ce phénomène d'alliesthésie, c'est-à-dire le fait qu'un même stimulus peut être perçu comme plaisant ou déplaisant selon les conditions internes de l'organisme, a été mis en évidence chez l'homme et est spécifique des odeurs alimentaires (Cabanac 1971;

Duclaux et al. 1973). Ainsi, lorsque l'organisme est rassasié et qu'il n'a plus besoin de s'alimenter pour reconstituer les stocks énergétiques, le caractère déplaisant des odeurs alimentaires provoqué par le phénomène d'alliesthésie négative peut induire l'arrêt de l'ingestion de nourriture.

Nous avons mis en évidence dans cette première partie du chapitre que le système olfactif participe à la survie de l'animal à long-terme en influençant ses comportements au quotidien. Pour ce faire, le système olfactif détecte les molécules odorantes de l'environnement et intègre le message olfactif pour induire une réponse comportementale, innée ou apprise par association, et adaptée à la situation environnementale et à l'état interne de l'organisme.

L'olfaction repose sur deux étapes : premièrement la détection des odeurs dans la cavité nasale par le système olfactif dit périphérique, puis l'intégration de ce signal dans le cerveau par le système olfactif central. Nous allons maintenant décrire l'organisation et le fonctionnement de ces systèmes dans notre modèle d'étude, la souris.

## II. Détection des odeurs par le système olfactif périphérique

### 1. Organisation générale du système olfactif périphérique

Le système olfactif périphérique assure la première étape de détection de l'information olfactive et comprend, chez le rongeur, plusieurs organes situés dans la cavité nasale : l'épithélium olfactif (EO) principal, l'organe voméronasal (OVN), l'organe septal (OS) et le ganglion de Grueneberg (GG) (Figure 2). La fonction de chaque organe dépend des récepteurs exprimés par les neurones olfactifs, des molécules détectées et de la zone du cerveau où l'information olfactive sera envoyée.

L'EO principal est majoritairement impliqué dans la détection des odeurs de l'environnement, alors que l'OVN (ou système olfactif accessoire) est plutôt spécialisé dans la reconnaissance des phéromones.

Le GG est une structure neuronale située près de l'ouverture des narines et a été identifié pour la première fois en 1973 par Grueneberg. Ce compartiment olfactif aurait un double rôle sensoriel puisque les neurones du GG répondent à certaines odeurs (Mamasuew et al. 2011), mais aussi aux températures ambiantes fraîches (Schmid et al. 2010). Les neurones

seraient alors plus sensibles lorsque la température ambiante baisse et que les molécules odorantes volatiles deviennent plus rares.

L'OS est quant à lui situé à la base du septum nasal. Ses propriétés physiologiques et sa fonction sont peu connues, mais les voies de transduction du signal olfactif, les propriétés de réponse aux odorants et les projections au niveau du bulbe olfactif (BO) ressemblent fortement à celle de l'EO principal (Ma et al. 2003).

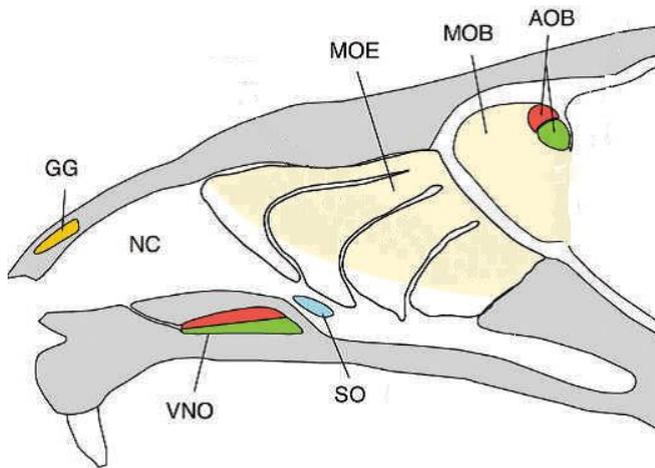


Figure 2 : Le système olfactif de la souris

Le système olfactif comprend une partie périphérique, à l'intérieur de la cavité nasale (NC) et une partie centrale.

Le système olfactif périphérique est composé de plusieurs organes : l'épithélium olfactif principal (MOE), l'organe voméronasal (VNO), l'organe septal (SO) et le ganglion de Grueneberg (GG). Le bulbe olfactif se divise en bulbe olfactif principal (MOB) et accessoire (AOB).

D'après Brennan & Zufall 2006.

Dans la suite du manuscrit, nous nous intéresserons plus particulièrement à l'EO et à l'OS.

## 2. Anatomie de l'EO principal

L'EO est un neuro-épithélium pseudo-stratifié qui tapisse la cavité nasale dorso-postérieure, le long des cornets (ou replis olfactifs, permettant d'augmenter la surface de détection) et le long du septum nasal. Cet épithélium repose sur une lame basale (*lamina propria*), le tout constituant la muqueuse olfactive (MO) (Figure 3).

L'EO est recouvert par une couche de mucus et contient plusieurs types cellulaires.

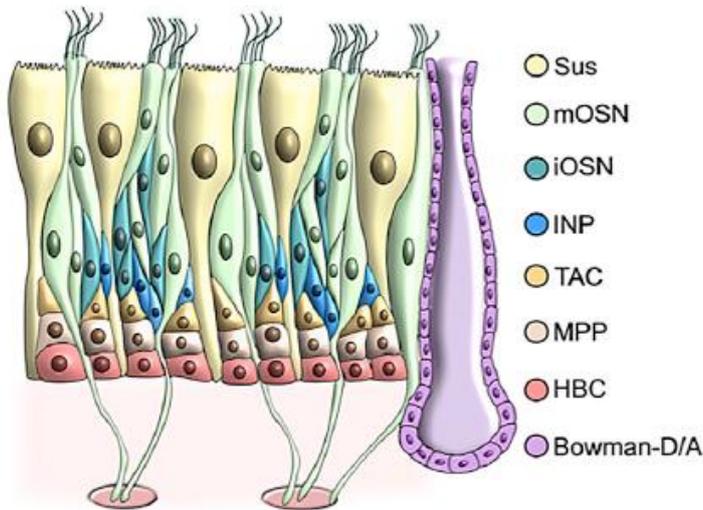


Figure 3 : Représentation schématique de l'EO principal

Sus : cellules de soutien, mOSN : neurone sensoriel olfactif mature, iOSN : neurone sensoriel olfactif immature, INP : précurseur neuronal immédiat, TAC : cellule amplificatrice transitoire, MPP : progéniteur multipotent, HBC : cellule basale horizontale, Bowman-D/A : canal de Bowman / cellule acineuse. D'après Konkimalla & Tata 2017.

#### a) *Le mucus*

Le mucus est un liquide aqueux, à travers lequel les odorants, bien souvent volatils et hydrophobes, doivent diffuser pour atteindre les cils des neurones olfactifs. Le mucus est sécrété par les glandes de Bowman, situées dans la lame basale de la MO, via des canaux sécrétoires traversant l'épithélium olfactif. Sa composition est complexe et n'a pas été complètement décrite. Le mucus contient en particulier des protéines liant les molécules olfactives (*Olfactory Binding Proteins*, OBP). Les OBP sont des protéines solubles et de petite taille, qui fixent les odorants de manière réversible (Pelosi 1994). Elles semblent donc avoir pour rôle d'augmenter la solubilité et la vitesse de transport des odorants (Heydel et al. 2013).

#### b) *Les neurones sensoriels olfactifs*

Les cellules spécialisées dans la détection des odeurs sont les neurones sensoriels olfactifs (OSNs, Figure 4). On en dénombre 20 millions dans l'EO de souris et une dizaine de millions chez l'homme (Firestein 2001; Moran et al. 1982). Les OSNs sont des neurones bipolaires : ils possèdent d'une part un unique axone non ramifié et non myélinisé qui fait synapse dans le bulbe ; et d'autre part une dendrite qui projette vers la surface de l'EO. Cette dendrite se termine en un renflement, appelé bouton dendritique, d'où émanent des cils olfactifs.

Le nombre et la taille des cils varient selon les espèces. Chez les mammifères, les OSNs comprennent en moyenne 15-20 cils olfactifs, qui mesurent environ 15 à 50  $\mu\text{m}$  de longueur et 0,10  $\mu\text{m}$  de diamètre (Menco & Morrison 2003).

La longueur des cils dépend de la localisation de l'OSN au sein de l'épithélium. Il existe en effet un gradient de longueur suivant l'axe antéro-postérieur dans la zone dorsale de l'épithélium (Challis et al. 2015). Les OSNs possédant les plus longs cils sont situés dans les régions fortement exposées au flux d'air, et ont une meilleure sensibilité odorante. La création d'une large surface de contact avec le mucus augmente les chances de détecter des odeurs faiblement concentrées. A l'inverse, les OSNs possédant les cils les plus courts sont situés dans les zones moins exposées au flux d'air, donc dans les zones atteintes seulement par des stimuli odorants très concentrés. Ces OSNs ont un seuil de détection plus élevé et sont moins susceptibles d'être saturés, ce qui les rend mieux adaptés pour l'encodage de l'intensité odorante à forte concentration. Les auteurs ont de plus montré que le gradient de longueur était déjà établi à la naissance, maintenu à l'âge adulte et restauré après destruction et régénération de l'EO.

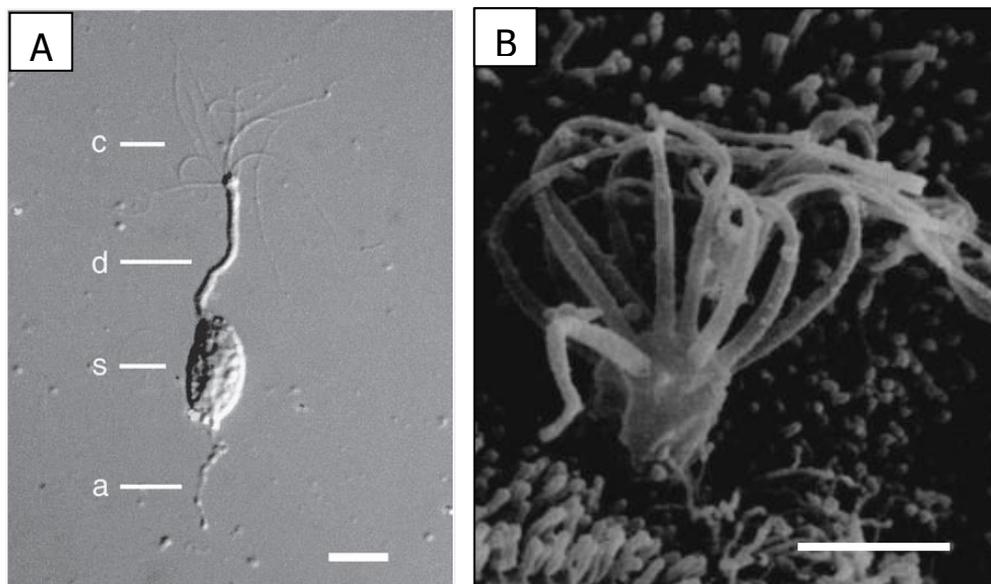


Figure 4 : Structure d'un OSN

A. Photographie d'un neurone olfactif isolé de Grenouille. c : cil olfactif, d : dendrite, s : soma ou corps cellulaire, a : axone. La barre d'échelle correspond à 10  $\mu\text{m}$ . D'après Kleene & Gesteland 1981. B. Vue tri-dimensionnelle d'un bouton dendritique donnant naissance à de multiples cils olfactifs, sur un neurone olfactif d'Homme. La barre d'échelle correspond à 1  $\mu\text{m}$ . D'après Morrison & Costanzo 1990.

Les cils constituent le site de la transduction olfactive. En effet, Adamek et collaborateurs ont mis en évidence en 1984 une relation proportionnelle entre les réponses obtenues en électro-olfactogramme (EOG) et la longueur des cils olfactifs. Après destruction des cils par un détergent, la régénération progressive était associée à une augmentation de l'amplitude de l'EOG jusqu'à atteindre un palier après régénération complète des cils (40  $\mu\text{m}$  de longueur) (Adamek et al. 1984). Comme l'EOG enregistre le résultat des courants récepteurs dépolarisants suite à une stimulation odorante des OSNs, les auteurs en ont déduit que les récepteurs olfactifs (RO) se situaient majoritairement au niveau des cils, et plus précisément dans la partie proximale. Le site de la transduction olfactive a été confirmé par l'identification des éléments constituant la cascade de transduction dans les cils olfactifs (Jones & Reed 1988; Bakalyar & Reed 1990; Dhallan et al. 1990).

En recouvrant l'EO, les cils olfactifs forment un réseau dense à l'interface air-mucus qui permet d'augmenter la surface neuronale en contact avec les odorants et ainsi optimise la détection olfactive.

Les OSNs ont pour rôle de détecter les odeurs. Mais la plupart de ces senseurs chimiques présentent également une sensibilité mécanique (Grosmaître et al. 2007). Lors d'enregistrements en patch-clamp, de nombreux OSNs répondent non seulement aux odorants, mais aussi à des stimulations mécaniques générées par la pression d'éjection d'une solution aqueuse non odorante. Les deux types de réponse, odorante et mécanique, semblent médiées par une cascade de signalisation AMPc-dépendante commune. Des propriétés similaires à la réponse odorante ont été mises en évidence pour la réponse mécanique (latence, adaptation aux stimulations répétées, inversion de potentiel). La sensibilité mécanique des OSNs permet en outre d'améliorer la réponse odorante lors d'une stimulation faible, et semble guider l'activité rythmique du bulbe olfactif pour la synchronisation avec la respiration.

On distingue parfois l'olfaction en deux composantes : l'échantillonnage olfactif (« *sniffing* », action d'inspirer une certaine quantité d'air), et la perception réelle de l'odeur (« *smelling* »), qui sont toutes deux nécessaires pour une sensibilité olfactive optimale (Mainland & Sobel 2006). Ainsi, lorsqu'un odorant est présent en faible concentration, une forte inspiration pourrait entraîner une réponse mécanique des OSNs afin d'initier leur réponse à l'odorant peu concentré.

### *c) Les cellules à microvillosités*

Au sein de l'EO, on trouve un second type cellulaire capable de répondre aux odeurs : les cellules à microvillosités (Hegg et al. 2010). Contrairement aux OSNs, la plupart des cellules à microvillosités ne projettent pas d'axone vers le BO (Hegg et al. 2010; Hansen & Finger 2008). Des stimulations exogènes par l'adénosine triphosphate (ATP) et la substance P (contenue dans les axones des fibres trigéminales) entraînent également une réponse des cellules à microvillosités (Hegg et al. 2010). La fonction de ces cellules au sein de l'EO n'est pas très claire. Les cellules à microvillosités auraient un rôle paracrine et produiraient des facteurs trophiques à destination des autres types cellulaires de l'EO, sous contrôle des stimulations odorantes et/ou trigéminales (Montani et al. 2006; Jia & Hegg 2010).

### *d) Les cellules de soutien*

Les cellules de soutien (*supporting cells = sustentacular cells*) sont des cellules non-neuronales possédant des microvillosités sur leur surface apicale. Leur rôle est d'assurer la cohésion de l'EO. Les cellules de soutien ont également un rôle d'épuration des éléments toxiques au sein de l'EO, puisqu'elles expriment de nombreuses enzymes du métabolisme des xénobiotiques (P450, UGT2A1) (Chen et al. 1992; Heydel et al. 2001). Ces enzymes de détoxification permettent l'élimination des substances exogènes nocives et auraient un rôle dans la clairance des molécules odorante dans l'espace péri-récepteur afin de préserver la sensibilité des OSNs (Heydel et al. 2010).

### *e) Les cellules basales*

Les cellules basales constituent les cellules souches de l'EO et sont de deux types : les cellules globulaires situées sous la couche neuronale, et les cellules horizontales, au contact direct de la lame basale. Les cellules globulaires prolifèrent pour s'auto-renouveler et générer tous les types cellulaires de l'EO, neuronaux et non-neuronaux. Les cellules horizontales sont au contraire plutôt quiescentes au sein d'un EO sain. Si l'EO est par contre endommagé, le potentiel multipotent des cellules horizontales va être activé pour générer de nouveaux progéniteurs neuronaux et non-neuronaux (Konkimalla & Tata 2017).

### *f) Les cellules engainantes*

Les cellules engainantes (*Olfactory Ensheathing Cells, OEC*) sont des cellules gliales périphériques (semblables aux cellules gliales du système nerveux central) qui entourent les axones des OSNs, depuis leur base à la sortie de l'EO jusque dans le BO. Les OEC n'entourent pas les axones individuellement mais par groupes de 50 à 200 axones (Doucette 1993). Ce contact direct permet des interactions entre les axones des OSNs en termes de métabolisme, flux ioniques et courant électrique pendant la transduction (Eng & Kocsis 1987; Gesteland 1986). Elles joueraient un rôle dans la médiation de la survie neuronale et dans la croissance et régénération des axones des OSNs (Ramón-Cueto & Avila 1998). En favorisant la croissance axonale, les OEC pourraient constituer un potentiel thérapeutique de régénération après dommages nerveux (Franklin & Barnett 2000; Imaizumi et al. 2000; Ramón-Cueto & Avila 1998).

Au sein de l'EO, ce sont les OSNs qui assurent la transduction du signal olfactif.

### 3. Transduction du signal olfactif dans l'EO principal

Les OSNs convertissent le stimulus chimique porté par les molécules odorantes en réponses électriques transmissibles et déchiffrables par le cerveau. Cette première étape de détection des odeurs se fait grâce à une cascade d'évènements initiés par l'interaction des odorants avec les RO, situés au niveau des cils des OSNs.

#### *a) Les récepteurs olfactifs*

Dès les années 1940, Le Magnen proposait une « théorie immunologique de l'olfaction » (Le Magnen 2001). Il suggérait en effet que l'épithélium nasal contenait des récepteurs, c'est-à-dire des protéines spécifiques possédant une relation avec les odeurs semblables à celle que l'on connaissait entre les anticorps et les antigènes.

Ce n'est que 50 ans plus tard, en 1991, que les RO ont été identifiés par Linda Buck et Richard Axel suite à la découverte d'une très vaste famille de récepteurs couplés à une protéine G (RCPG), exprimés spécifiquement dans l'épithélium olfactif de rat (Buck & Axel 1991). Chez l'Homme, on compte presque 400 différents types de RO (Niimura & Nei 2003), ce qui est peu comparé aux 1300 types de RO trouvés chez la souris (Zhang & Firestein

2002), et 1430 chez le rat (Gibbs et al. 2004). La grande variabilité des RO offre une explication moléculaire à la capacité de détection et discrimination des nombreux ligands olfactifs (Firestein 2001).

Il faut toutefois noter qu'une partie des RO (probablement un faible nombre) possède des fonctions non-olfactives. Ceci est supporté par le fait qu'on trouve des RO dans d'autres organes que le nez. Par exemple, le récepteur hOR17-4 a été identifié dans les testicules et serait impliqué dans la chimiotaxie des spermatozoïdes, jouant ainsi un rôle potentiel dans la fertilité (Spehr 2003; Sinding et al. 2013).

Dans le système olfactif, les RO sont situés au niveau des cils des OSNs, au contact avec le mucus où les odeurs sont présentes. Un OSN exprime généralement un seul type de RO (ou quelques-uns très peu nombreux) (Malnic et al. 1999 ; Buck 1996). La signalisation d'un OSN isolé reflète donc l'activité d'un type de RO en particulier.

Il semble exister une organisation spatiale particulière des RO au sein de l'épithélium. Un RO donné est exprimé par quelques milliers de neurones (Bressel et al. 2016), regroupés dans une zone particulière de l'EO mais répartis aléatoirement au sein de cette zone (Ressler et al. 1993; Vassar et al. 1993). La concentration de neurones exprimant un RO donné dans une même zones crée des « *hot spots* », c'est-à-dire des zones préférentielles de réponse à un odorant donné, révélées lors d'enregistrements physiologiques (Thommesen & Doving 1977; Edwards et al. 1988).

Les ligands des RO sont des molécules volatiles appelées odorants, et l'identification des ligands pour un RO donné est compliquée. Cependant, des études sont parvenues à établir des listes de molécules reconnues par certains RO. Par exemple, le récepteur M71 répond à l'acétophénone et au benzaldéhyde (Bozza et al. 2002), l'eugénol est un ligand du récepteur mOR-EG (Katada 2005), et le lylal est reconnu par MOR23 (Touhara et al. 1999).

Classiquement, les RO répondent à un petit groupe de molécules de structures similaires, leur conférant une certaine sélectivité dans leur réponse aux odorants. Il existe toutefois des exceptions : le récepteur SR1 a par exemple un profil de réponse très large.

Les récepteurs dont aucun ligand n'a été identifié sont quant à eux appelés « récepteurs orphelins ».

En 2001 a été découverte une nouvelle famille de RCPG reconnaissant des amines biogènes, présentes en faibles quantités dans le système nerveux des mammifères et supposées jouer

le rôle de neurotransmetteurs (Borowsky et al. 2001). Ces récepteurs, nommés TAARs (*Trace Amine-Associated Receptors*), se répartissent en deux catégories. La première catégorie (TAAR1) est impliquée dans la régulation de l'excitabilité neuronale et dans l'utilisation des neurotransmetteurs (Liberles 2015). La seconde catégorie a été identifiée comme une deuxième classe de récepteurs sensoriels au sein de l'EO (Liberles & Buck 2006), différente de la famille des RO décrite précédemment. Le répertoire des TAARs est bien plus restreint que celui des RO, puisque l'on dénombre une quinzaine de TAARs chez le rongeur et 6 chez l'homme (Liberles 2015). Les ligands des TAARs, les amines biogènes, portent une information éthologique et sont des molécules odorantes connues pour induire des réponses comportementales innées. Par exemple, TAAR4 détecte la 2-phényléthylamine, une odeur de prédateur carnivore qui induit un comportement d'évitement chez les rongeurs (Ferrero et al. 2011) ; et TAAR5 détecte des composés présents dans l'urine, comme la triméthylamine (Li et al. 2013). Ces amines biogènes peuvent également être détectées par les récepteurs de l'OVN (Ferrero & Liberles 2010).

La signalisation olfactive induite par l'activation des TAARs (cascade de transduction et activation des glomérules bulbaires) est semblable à celle induite par l'activation des RO.

#### *b) La cascade de signalisation*

La transduction olfactive est initiée lorsqu'une molécule odorante se fixe sur un récepteur (RO ou TAAR). La liaison odeur-récepteur se fait au niveau d'une poche entourée par les domaines transmembranaires 3, 5 et 6 du récepteur (Katada 2005; Saito et al. 2009). La liaison semble médiée par des interactions hydrophobes et de Van Der Waals, liaison plus faible que la plupart des autres RCPG, qui eux forment des liaisons ioniques ou hydrogènes avec leurs ligands (Katada 2005). Mais la structure précise des RO n'étant pas encore complètement connue, le mécanisme d'interaction entre une molécule odorante et un RO reste mal compris.

Une cascade d'évènements est ensuite activée pour transformer le signal chimique en un signal électrique. Ces évènements comprennent la production d'un second messenger, dont le rôle est de moduler l'ouverture de canaux ioniques pour induire une dépolarisation membranaire et déclencher des potentiels d'action.

Chez les mammifères, c'est la voie canonique dépendante de l'adénosine monophosphate cyclique (AMPC) qui est impliquée (Figure 5). La liaison d'une molécule odorante sur le récepteur active une protéine G spécifique des OSNs ( $G_{olf}$ ) (Jones & Reed 1988). La sous unité  $\alpha$  de  $G_{olf}$  active à son tour l'adénylyl cyclase de type III (ACIII) (Bakalyar & Reed 1990). L'ACIII convertit l'ATP, molécule intracellulaire abondante, en AMPC, molécule de signalisation, ce qui augmente la teneur en AMPC intra-ciliaire. Trois molécules d'AMPC sont nécessaires à l'ouverture du canal ionique CNG (*Cyclic Nucleotide-Gated channel*) perméable aux cations (Nakamura & Gold 1987; Dhallan et al. 1990). L'entrée de  $Na^+$  et de  $Ca^{2+}$  par les canaux CNG créent un courant entrant qui dépolarise le neurone (Kurahashi 1989). Si l'accumulation de  $Ca^{2+}$  est suffisante, ce dernier va déclencher l'ouverture d'un second type de canal, le  $Ca^{2+}$ -gated  $Cl^-$  channel (Lowe & Gold 1993; Reisert et al. 2003). Ce canal permet un efflux de  $Cl^-$ , donc un courant entrant qui dépolarise encore plus le neurone. Si la dépolarisation est suffisante, le neurone génère alors un ou plusieurs potentiels d'action qui seront propagés le long de l'axone.

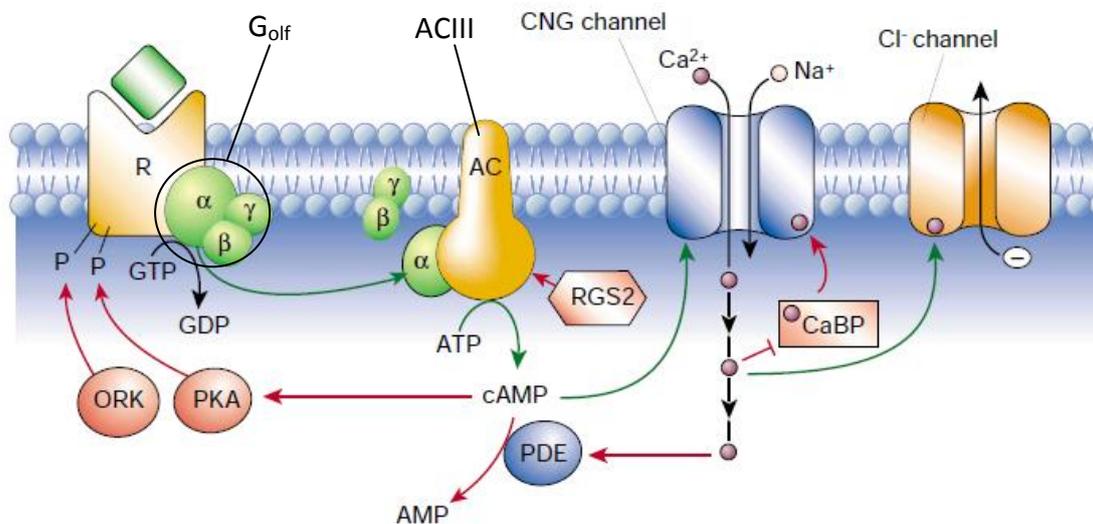


Figure 5 : Représentation de la cascade de signalisation AMPC-dépendante

Les flèches vertes représentent l'activation successive des éléments de la cascade de transduction olfactive AMPC-dépendante. L'activation du récepteur olfactif (R) induit l'activation d'une protéine G ( $G_{olf}$ ) qui active à son tour l'adénylyl cyclase III (ACIII). Il en résulte une production d'AMPC qui entraîne l'ouverture des canaux CNG (*cyclic nucleotide-gated ion channel*), permettant une entrée de calcium et de sodium, à l'origine de la dépolarisation membranaire, amplifiée ensuite par l'ouverture des canaux perméables au  $Cl^-$ . En rouge, quelques mécanismes de terminaison du signal par inactivation du courant récepteur. Le calcium permet la rétro-inhibition des canaux CNG, et active la phosphodiésterase (PDE) qui dégrade l'AMPC en AMP. D'après Firestein 2001.

L'AMPc constitue donc un second messenger crucial dans la réponse odorante des OSNs. On peut également noter son rôle dans d'autres aspects du fonctionnement des OSNs comme le guidage des axones (Imai et al. 2006) et la ciliogenèse (Kaneko-Goto et al. 2013).

La terminaison du signal comprend la suppression du courant récepteur entrant et la repolarisation du neurone afin qu'il retrouve son état initial. Plusieurs mécanismes entrent alors en jeu et interviennent rapidement après la genèse du courant récepteur dans le but de l'inactiver.

Le calcium exerce un rétrocontrôle négatif sur le canal permettant son entrée dans la cellule. Lorsque la concentration en  $Ca^{2+}$  à l'intérieur des cils atteint environ  $2 \mu M$ , sa liaison avec des facteurs sensibles au calcium (comme la calmoduline) réduit la sensibilité des canaux CNG pour l'AMPc (Kleene 1999). Cette rétro-inhibition de l'entrée de  $Ca^{2+}$  permet la restauration des concentrations basales en  $Ca^{2+}$  et joue un rôle majeur dans le rétablissement de la sensibilité des neurones après une stimulation odorante brève.

Le calcium peut également stimuler, via la calmoduline kinase II (CaMKII), une phosphodiesterase dépendante de la calmoduline (CAM-PDE, ou PDE1C2), qui va hydrolyser l'AMPc (Borisy et al. 1992; Yan et al. 1995) et contribuer à l'inactivation du courant récepteur.

La protéine RGS2 (*Regulator of G-protein Signaling*) jouerait un rôle au niveau de l'ACIII pour diminuer son activité (Sinnarajah et al. 2001), et des kinases (PKA : protéine kinase A, ORK : *Olfactory Receptor Kinase*) seraient impliquées dans l'inactivation des récepteurs olfactifs par phosphorylation (Dawson et al. 1993; Schleicher et al. 1993).

Ces mécanismes de terminaison du signal permettent une adaptation des OSNs aux stimulations odorantes prolongées et/ou répétées qui se manifeste par une réduction temporaire de leur sensibilité. Lors de deux stimulations odorantes brèves et consécutives, la réponse des OSNs à la deuxième stimulation est plus faible. Lorsqu'une odeur est présentée de manière prolongée, un déclin de la réponse neuronale est observé malgré la présence de l'odeur (Zufall & Leinders-Zufall 2000). Ces phénomènes d'adaptation à court terme et de désensibilisation s'avèrent essentiels pour prévenir la saturation du système de transduction et permettent de garder une bonne performance lors de stimulations durables ou répétées.

La terminaison du signal est complètement effective lorsque les gradients ioniques de repos du neurone sont rétablis. En effet, lors de la stimulation odorante, les concentrations intra-

ciliaires de plusieurs ions sont modifiées : on observe une augmentation de la teneur en  $\text{Ca}^{2+}$  et  $\text{Na}^+$ , et une déplétion des stocks de  $\text{Cl}^-$  et  $\text{K}^+$ .

L'expulsion du  $\text{Ca}^{2+}$  semble être assurée par deux mécanismes : d'une part à travers l'échangeur  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  (NCX), qui a une faible affinité pour  $\text{Ca}^{2+}$  ( $K_{1/2} > 1\mu\text{M}$ ) et une grande capacité de transport, et d'autre part grâce à l'ATPase membranaire PMCA (*Plasma Membrane Calcium ATPase*), dont plusieurs isoformes ont été identifiées dans les cils olfactifs (Kleene 2008).

La stimulation odorante induit également une accumulation de sodium, amplifiée par le fonctionnement de l'échangeur NCX. Une  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase localisée dans les cils olfactifs (Kern et al. 1991; Mayer et al. 2008) semble être utilisée pour rétablir les concentrations intracellulaires en  $\text{Na}^+$  et contribuer à l'entrée de  $\text{K}^+$ .

Enfin, la régénération des stocks de  $\text{Cl}^-$  et  $\text{K}^+$  semble possible via un co-transporteur  $\text{K}^+/\text{Cl}^-$  (KCC) (Kleene 2008).

Le schéma classique de signalisation olfactive par la voie de l'AMPc apparaît donc plutôt bien établi. En outre, des mutations génétiques affectant les molécules impliquées dans cette cascade de signalisation entraînent des dysfonctions olfactives comme l'anosmie ou l'hyposmie (McEwen et al. 2008).

D'autres systèmes de transduction semblent également coexister avec la voie canonique de l'AMPc dans des sous-populations distinctes d'OSNs.

Certaines populations d'OSNs expriment le récepteur orphelin guanylyl cyclase D (GC-D) (Fulle et al. 1995). La transduction serait alors médiée par le guanosine monophosphate cyclique (GMPC) et non l'AMPc au sein de ces OSNs, qui expriment une sous-unité du canal CNG dépendante du GMPC (CNGA3) et une phosphodiesterase activable par le GMPC (Meyer et al. 2000; Juilfs et al. 1997). Ces OSNs exprimant le GC-D détectent en particulier des hormones natriurétiques présentes dans l'urine de souris, indiquant un possible rôle de cette population d'OSNs dans la régulation de l'équilibre sodique (Leinders-Zufall et al. 2007). L'expression d'une anhydrase carbonique (enzyme catabolisant le  $\text{CO}_2$ ) a également été mise en évidence dans les OSNs exprimant le GC-D, révélant un deuxième rôle de ces OSNs particuliers dans la détection des concentrations atmosphériques de  $\text{CO}_2$  (Hu et al. 2007).

La transduction sensorielle au sein des neurones de l'OVN implique le canal cationique TRPC2, équivalent du canal CNGA2 des OSNs. Mais l'expression de TRPC2 a également été trouvée dans certains OSNs de l'EO. Ces OSNs expriment à la fois CNGA2 et TRPC2 et

peuvent être distingués en deux catégories : le type A, caractérisé par l'expression d'ACIII, et le type B, qui n'exprime aucun RO ni ACIII, mais une guanylate cyclase soluble (*Gucy1b2*) ([Omura & Mombaerts 2014, 2015](#); [Saraiva et al. 2015](#)). La fonction biologique des OSNs exprimant TRPC2 et de type B serait de détecter les environnements pauvres en oxygène ([Bleymehl et al. 2016](#)).

L'expression du canal TRPM5, en co-expression avec la phospholipase C (PLC), a également été mise en évidence au sein d'OSNs matures exprimant la voie canonique de l'AMPc ([Lin et al. 2007](#)). Ces OSNs seraient impliqués dans la transduction sensorielle des phéromones au sein de l'EO.

Enfin, certains OSNs expriment une cascade dépendante de l'inositol 1,4,5-triphosphate ( $IP_3$ ), qui constitue la voie de transduction principale chez les invertébrés ([Figure 6](#)). La liaison odeur-récepteur entraîne l'activation de deux enzymes : la phosphoinositide 3-OH kinase (PI3K), qui phosphoryle le phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate membranaire ( $PIP_2$ ) en phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate ( $PIP_3$ ) ; et la PLC, qui clive le  $PIP_2$  pour en extraire l' $IP_3$ . L' $IP_3$  va ensuite interagir un récepteur membranaire pour permettre l'entrée de calcium dans le cil olfactif ([Cunningham et al. 1993](#)). L'action concertée du  $PIP_3$  et du calcium entraîne l'ouverture d'un canal cationique non sélectif responsable du courant récepteur. Ce canal est sensible au calcium et au sodium, et serait un homologue des canaux ioniques TRP ([Bobkov & Ache 2005](#)).

L'existence de plusieurs voies de transduction au sein d'un même OSN permettrait de détecter simultanément plusieurs stimuli chimiques, odorants ou non, et ainsi de traiter l'information portée par les stimuli complexes. Pour investiguer plus précisément l'implication fonctionnelle de ces différentes voies de transduction au sein de l'EO, il est nécessaire de déterminer si certains RO seraient préférentiellement co-exprimés avec une voie en particulier, et si tel est le cas d'identifier les ligands de ces RO.

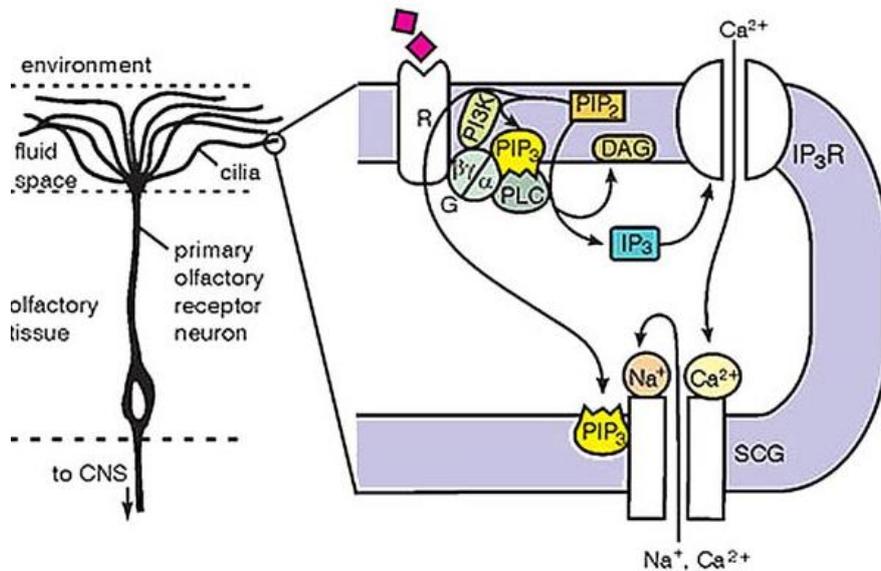


Figure 6 : Représentation de la cascade de signalisation IP<sub>3</sub>-dépendante

La liaison d'une molécule odorante au récepteur induit l'activation d'une phospholipase C (PLC) et d'une phosphoinositide 3-OH kinase (PI3K). Il en résulte la production de diacylglycérol (DAG), d'inositol 1,4,5-triphosphate (IP3) et de phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate (PIP3) à partir du phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP2) membranaire. L'entrée de calcium par les canaux activés par IP3 (IP3R) et l'action de PIP3 seraient à l'origine de l'ouverture de canaux cationiques non sélectifs modulés par le sodium et le calcium (SCG) pour générer l'essentiel du courant récepteur. D'après Ache & Young 2005.

#### 4. Un organe olfactif particulier : l'organe septal

##### a) *Localisation et anatomie*

L'OS, également appelé organe de Masera, a été décrit pour la première fois en 1943. Il constitue un sous-système de l'EO principal et possède des caractéristiques histologiques similaires. L'organe de Masera est présent dans la cavité nasale de nombreuses espèces de mammifères, en particulier les rongeurs. Situé à la base du septum nasal, l'OS forme un îlot d'EO au sein de l'épithélium respiratoire (Figure 7).

Les OSNs de l'OS présentent un corps cellulaire plus ramassé, des dendrites plus courtes et des boutons dendritiques un peu plus larges (3 mm au lieu de 1-2 mm) que les OSNs de l'EO. L'OS possède également des cellules de soutien, des glandes de Bowman, et des cellules basales (Ma et al. 2003).

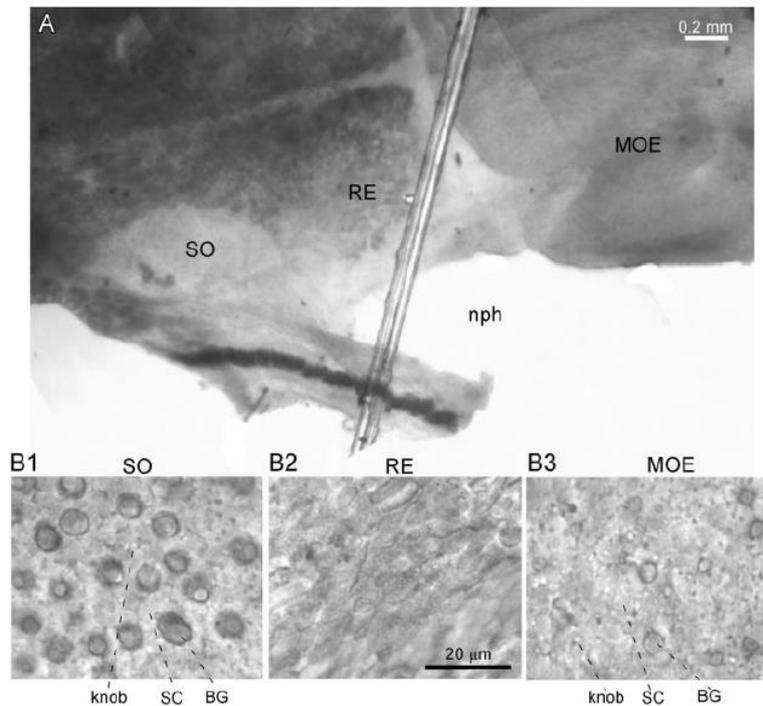


Figure 7 : Visualisation de l'organe septal au microscope à contraste interférentiel différentiel

A. Base ventrale d'un épithélium septal intact de souris. L'organe septal (SO) est séparé de l'épithélium principal (MOE) et entouré d'épithélium respiratoire (RE). np : nasopharynx. B. On retrouve dans l'organe septal (B1) et dans l'épithélium principal (B3) la même distribution de glandes de Bowman (BG), de cellules de soutien (SC) et de boutons dendritiques des neurones sensoriels olfactifs (knob). L'épithélium respiratoire (B2) est quant à lui caractérisé par la présence de cellules épithéliales possédant des cils en mouvement. D'après Ma et al. 2003.

### *b) Développement*

L'OS se détache de l'EO principal au cours du développement embryonnaire. Une accumulation de neurones exprimant la protéine marqueur des OSNs matures (OMP) apparaît dans la partie ventrale du septum à environ 16 jours de gestation chez la souris (Tian & Ma 2008). L'OS s'individualise ensuite progressivement avec la disparition des neurones dans la zone de transition avec l'EO principal. Son développement se poursuit après la naissance pour atteindre sa taille maximale à l'âge de 2 ou 3 mois (environ 0,2 mm<sup>2</sup>, soit 1% de la surface de l'épithélium principal).

### *c) Récepteurs olfactifs et transduction dans l'organe septal*

Par des approches immunohistochimiques et électrophysiologiques, la voie de l'AMPC a été identifiée comme étant la principale voie de transduction olfactive dans l'OS. En effet, la plupart des OSNs de l'OS expriment les protéines de cette cascade. De plus, des enregistrements en patch-clamp sur neurones individuels ont montré que les OSNs de l'OS répondent aux odorants de la même manière que les OSNs de l'EO principal, et que cette réponse peut être mimée par des activateurs de l'ACIII et des canaux CNG, et peut aussi être bloquée par un inhibiteur de l'ACIII (Ma et al. 2003).

Le profil d'expression des RO dans l'OS est bien établi, avec plus de 120 RO identifiés (Tian & Ma 2004). La règle de l'expression d'un seul type de RO par un OSN donné est conservée dans l'OS. Cependant, contrairement à l'EO principal où les RO sont exprimés assez uniformément au sein de la population neuronale, l'OS exprime principalement un nombre restreint de RO. Les neufs plus abondants couvrent l'équipement en RO de 95% des OSNs de l'OS, et le plus abondant en couvre à lui seul la moitié.

Ce RO est appelé SR1 (aussi connu sous le nom de MOR256-3, ou encore Olfr124). La population d'OSNs exprimant SR1 est très dense dans l'OS et répond à des odorants variés, incluant des aldéhydes (benzaldéhyde, heptanal), un acide (acide octanoïque), un ester (acétate d'amyle) et une cétone (camphre) (Grosmaître et al. 2009). SR1 est donc un récepteur à large spectre, qui confère par ailleurs aux OSNs qui l'expriment une capacité de réponse à une vaste gamme de concentrations, pouvant aller de  $10^{-10}$  M à  $10^{-4}$  M (Grosmaître et al. 2009).

### *d) Rôle(s) de l'organe septal*

Par des enregistrements en EOG, Marshall et Maruniak ont montré en 1986 que l'organe septal répond effectivement aux odeurs, et ce avec une forte sensibilité. En effet, l'amplitude des réponses odorantes obtenues dans l'organe septal excède l'amplitude de réponse enregistrée dans l'épithélium olfactif. Le seuil de détection des odeurs est également plus bas dans l'organe septal que dans l'épithélium principal (Marshall and Maruniak 1986).

La localisation de l'organe septal dans la cavité nasale est particulière et pourrait lui conférer un rôle spécifique en matière de détection olfactive. Sa position ventrale à proximité de la choane fait qu'il est situé directement sur le trajet de l'air. Le flux d'air lors de la respiration au repos atteint donc en premier l'organe septal, dont le rôle pourrait être de détecter des

molécules odorantes en vue d'alerter l'organisme lorsqu'il est au repos (Ma et al. 2003; Giannetti et al. 1995). Ainsi, en concentrant des neurones très sensibles et répondant à une multitude d'odeurs dans le flot de la respiration au repos, l'organe septal pourrait alerter l'organisme de la présence de molécules odorantes et ainsi inciter l'animal à exercer des inspirations plus poussées pour chercher à identifier plus précisément le stimulus odorant.

Au sein du système olfactif périphérique, l'EO et l'OS détectent les odorants et convertissent le message porté par ces molécules chimiques en signal électrique. Le message olfactif est alors transmis au système olfactif central.

### III. Perception des odeurs par le système olfactif central

Le second « étage » du système olfactif correspond aux structures cérébrales impliquées dans le traitement du message olfactif provenant de l'EO principal. Le BO est le premier relais central de l'information olfactive, et reçoit directement les terminaisons axonales des OSNs.

#### 1. Les connexions épithélio-bulbaires

Les axones des OSNs projettent vers le BO principal, situé dans la partie antérieure du cerveau chez le rongeur. Les axones des OSNs exprimant un même RO convergent vers deux zones topographiques fixes dans le BO, appelées glomérules (un médian et un latéral) (Mombaerts 2006) (Figure 8). Ainsi, le BO fournit une carte topographique qui identifie les RO de l'EO activés par un odorant donné.

Les OSNs de l'OS projettent également leurs axones vers le BO principal. Les glomérules septaux sont les glomérules où projettent essentiellement des axones issus de l'OS et représentent environ 1% de la population glomérulaire du BO principal (Giannetti et al. 1992). Ils sont principalement situés dans la partie ventro-médiane du BO postérieur (Giannetti et al. 1992; Levai & Strotmann 2003). D'autres glomérules reçoivent également des afférences depuis l'OS, mais ceux-ci sont nettement moins nombreux (Levai & Strotmann 2003).

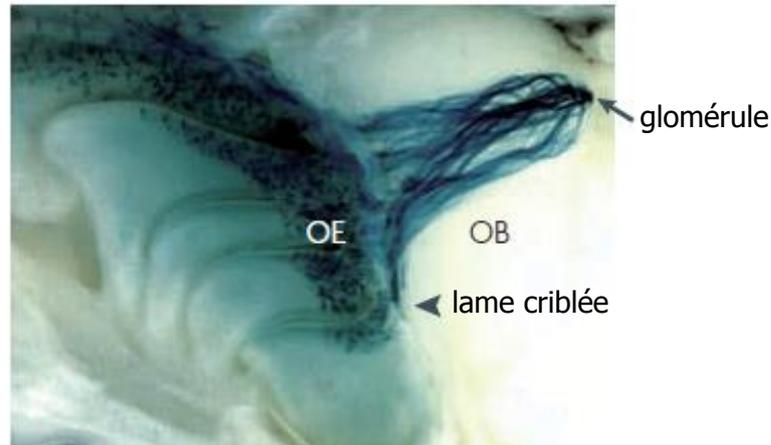


Figure 8 : Projections axonales des neurones exprimant un même récepteur olfactif

Les neurones exprimant le récepteur M71 (marqués en bleu) sont largement dispersés au sein de l'épithélium olfactif (OE) et projettent leurs axones vers un même glomérule médian dans le bulbe olfactif (OB). D'après Zou et al. 2009.

La précision topographique des projections axonales vers le BO implique une relation étroite entre la mise en place d'un RO particulier au sein d'un OSN et le guidage de son axone vers le glomérule spécifique associé.

En remplaçant la séquence codante d'un RO par la séquence d'un RO différent au sein d'une population d'OSNs donnée, Mombaerts et collaborateurs ont montré une différence dans l'établissement des connexions épithélio-bulbaires (Mombaerts et al. 1996). Au sein des OSNs exprimant le RO P2, les auteurs ont remplacé la séquence codante pour P2 par la séquence codante d'un autre RO, appelé M12. Ces OSNs modifiés par manipulation génétique ont projeté leurs axones vers un glomérule fixe différent du glomérule normalement atteint par les OSNs exprimant naturellement M12, et également différent mais proche du glomérule atteint par les OSNs exprimant P2 (Mombaerts et al. 1996). Ainsi, les RO participeraient au guidage des axones mais n'en seraient pas les seuls déterminants, et feraient alors partie intégrante d'un système de guidage axonal complexe.

Supportant cette hypothèse, les protéines constitutives des RO ont été détectées au niveau des axones des OSNs et de leurs terminaisons avant et pendant la formation des glomérules (Barnea et al. 2004; Strotmann et al. 2004). Les RO sont donc exprimés au sein d'un OSN au niveau des cils où ils détectent les odorants, et également au niveau de l'axone où ils reconnaissent des signaux de guidage afin de faire converger l'axone vers le glomérule approprié. Les mécanismes moléculaires impliqués dans le guidage axonal des OSNs ont été discutés dans de nombreuses revues (Mombaerts 2006; Zou et al. 2009; Murthy 2011; Sakano 2010; Lodovichi & Belluscio 2012).

## 2. Le bulbe olfactif, premier relais central de l'information olfactive

### a) *Organisation anatomique du bulbe olfactif*

Le BO est constitué de plusieurs couches concentriques, formées par différents types de neurones et de fibres (Figure 9). On trouve également de nombreux types de cellules gliales au sein du BO, qui modulent l'activité des neurones. On se focalisera ici sur les caractéristiques principales des cellules neuronales qui assurent le traitement et la transmission du signal olfactif (pour revue voir [Nagayama et al. 2014](#)).

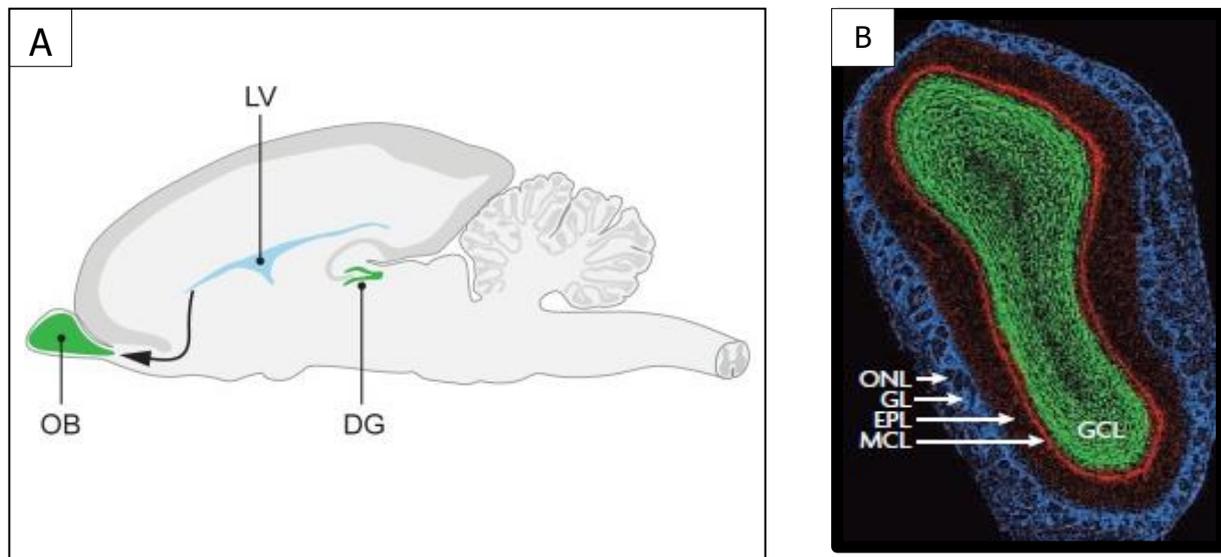


Figure 9 : Localisation et anatomie du bulbe olfactif de souris

(A) Le bulbe olfactif (OB) occupe la partie antérieure du cerveau chez le rongeur. LV : lateral ventricle, DG : dentate gyrus. D'après Ernst & Frisé 2015. (B) Coupe transversale d'un bulbe de souris. Les axones des neurones olfactifs recouvrent la couche la plus externe du bulbe, formant la couche des nerfs olfactifs (Olfactory Nerve Layer, ONL). Ces axones pénètrent dans les glomérules où ils sont au contact synaptique des projections des neurones de second ordre dans la couche glomérulaire (Glomerular Layer, GL). Les corps cellulaires des interneurons du bulbe sont situés autour et sous les glomérules, les corps cellulaires des cellules mitrales formant une couche individualisée (Mitral Cell Layer, MCL). Au centre du bulbe repose la couche granulaire (Granule Cell Layer, GCL), qui contient les interneurons immatures en migration. Entre cette couche glomérulaire et la couche des cellules mitrales, on trouve la couche plexiforme externe (External Plexiform Layer, EPL), où des interactions ont lieu entre les dendrites apicales des cellules granulaires et les dendrites latérales des cellules mitrales. D'après Zou et al. 2009.

Depuis la périphérie du bulbe vers la couche la plus interne, on distingue (Figure 10) :

➤ La couche des nerfs olfactifs

Elle est composée des axones des OSNs, regroupés en amas fibreux, qui apportent l'information sensorielle primaire depuis l'EO.

➤ La couche glomérulaire

Les glomérules constituent l'unité structurelle et fonctionnelle de traitement de l'information olfactive au niveau du BO (Mori et al. 1999). Ils sont formés par le regroupement des axones des OSNs exprimant un même RO, au contact synaptique des dendrites des neurones-relais et des interneurones locaux, et par des prolongements astrocytaires (Zou et al. 2009). Les neurones-relais du BO sont les cellules mitrales et les cellules à panache.

Les interneurones locaux qui innervent les glomérules sont appelés cellules juxtaglomérulaires (JG) et se distinguent en trois types : les cellules périglomérulaires (PG), les cellules superficielles à axone court (sSA) et les cellules externes à panache (ET, non représentées sur la figure 10) (Pinching & Powell 1971).

Les cellules PG sont les plus abondantes des cellules JG (Parrish-Aungst et al. 2007) et présentent une grande diversité moléculaire, en particulier en ce qui concerne les neurotransmetteurs exprimés, et une diversité d'innervation synaptique au sein des glomérules (Nagayama et al. 2014). Les cellules PG projettent généralement leurs dendrites à l'intérieur d'une partie restreinte d'un seul glomérule et possèdent ou non un axone (Nagayama et al. 2014).

Les cellules sSA étendent quant à elles leurs dendrites dans l'espace interglomérulaire exclusivement et possèdent un axone qui s'étend le long d'un ou deux glomérules (Pinching & Powell 1971).

Enfin, les cellules ET projettent des dendrites qui occupent un grand volume au du glomérule innervé et sont de types, suivant qu'elles possèdent ou non des dendrites secondaires qui s'étendent alors dans la couche plexiforme externe (Nagayama et al. 2014).

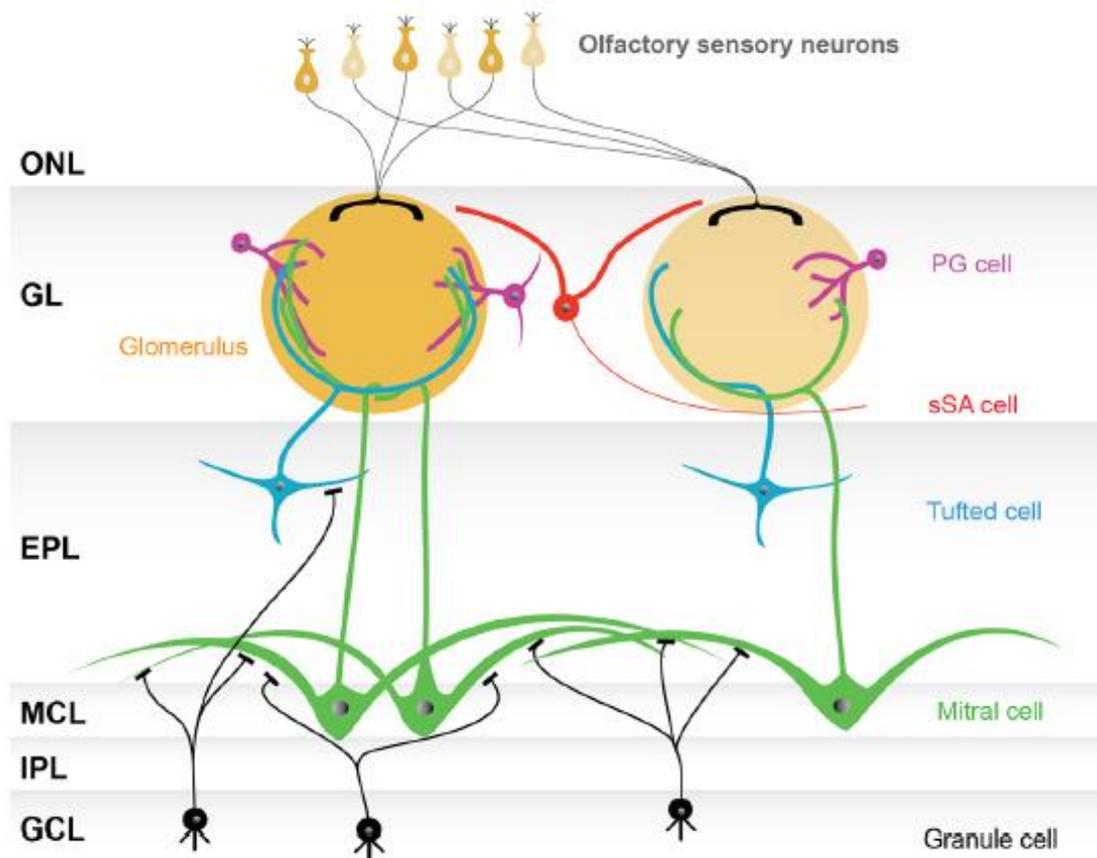


Figure 10 : Modélisation du réseau neuronal au sein du bulbe olfactif

Les axones des neurones sensoriels olfactifs (Olfactory sensory neurons) font synapse dans les glomérules de la couche glomérulaire (GL), chaque glomérule représentant un seul type de récepteur olfactif. Les neurones qui encerclent les glomérules sont appelés cellules juxtaglomérulaires et comprennent : les cellules périglomérulaires (PG), les cellules superficielles à axone court (sSA) et les cellules externes à panache (External Tufted cells). Les neurones-relais sont les cellules mitrales et les cellules à panache, qui envoient leurs axones vers le cortex olfactif. Le corps cellulaire des cellules mitrales se trouve dans la couche des cellules mitrales (MCL), tandis que les cellules à panache sont localisées entièrement dans la couche plexiforme externe (EPL). La couche plexiforme interne (IPL) est une couche fibreuse traversée par les axones des cellules mitrales et des cellules à panache, ainsi que par les dendrites des cellules granulaires. Ces dernières sont des interneurons dépourvus d'axones, dont le corps cellulaire est situé dans la couche granulaire (GCL). ONL = Olfactory Nerve Layer. D'après Nagayama et al. 2014.

➤ La couche plexiforme externe

Elle est traversée par les fibres dendritiques des cellules mitrales et des cellules à panache, appelées neurones-relais ou encore neurones de projection, et par les dendrites apicales des cellules granulaires (GC). On y trouve également les corps cellulaires des cellules à panache.

Les cellules mitrales et à panache présentent des caractéristiques morphologiques et fonctionnelles similaires. Elles projettent en particulier leur dendrite primaire vers un glomérule unique, établissent des interactions dendrodendritiques réciproques avec les cellules GC au niveau de leurs dendrites secondaires, et possèdent un axone qui s'étend jusqu'à la couche la plus interne du BO pour se projeter ensuite dans différentes structures du cortex olfactif (Nagayama et al. 2014). Chez le rongeur, les cellules à panache sont parfois décrites comme des « petites cellules mitrales », les deux types de neurone-relais étant généralement étudiés comme une seule et même classe de neurones.

On trouve également dans la couche plexiforme externe diverses populations d'interneurones locaux. La majorité de ces interneurones établit des contacts synaptiques médiés par l'acide  $\gamma$ -aminobutyrique (GABA) avec les cellules mitrales et à panache (Toida et al. 1994).

- La couche des cellules mitrales

Cette couche concentre les corps cellulaires des cellules mitrales.

- La couche plexiforme interne

Elle est constituée uniquement de fibres, à savoir les axones des cellules mitrales et des cellules à panache, et les dendrites apicales des GC.

- La couche granulaire

C'est la couche située la plus au cœur du bulbe olfactif, et elle contient les corps cellulaires des GC et leur dendrites basales, ainsi que d'autres populations d'interneurones. Les GC sont dépourvues d'axone, et projettent une dendrite apicale principale en direction de la partie externe du BO, non ramifiée au sein de la couche granulaire. L'arborisation dendritique apicale apparaît à partir de la couche plexiforme externe, les dendrites des GC portent alors des épines dendritiques qui constituent des sites d'interactions synaptiques dendrodendritiques réciproques avec les cellules mitrales et à panache (Nagayama et al. 2014). Le GABA est le seul neurotransmetteur identifié dans ces interneurones. Six différents types de GC ont été caractérisés et diffèrent par leur localisation précise, leur morphologie et l'expression de molécules spécifiques (Orona et al. 1983; Merkle et al. 2014; Naritsuka et al. 2009).

On trouve également d'autres interneurons que les GC au sein de la couche granulaire : ce sont des cellules profondes à axone court (dSA), initialement classées en quatre catégories selon leur morphologie (cellules de Blanes, cellules de Golgi, cellules horizontales et cellules de Cajal) (Nagayama et al. 2014). Une nouvelle classification a été établie en fonction du site de projection de leurs axones (couche glomérulaire, plexiforme externe ou granulaire), définissant trois sous-populations de cellules dSA (Eyre et al. 2008).

On remarque une organisation verticale au sein du BO, qui permet une activation dite en « colonnes » des différents neurones et une intégration efficace du signal apporté par les terminaisons axonales des OSNs depuis l'EO.

### *b) Intégration bulbaire de l'information olfactive*

La première étape de l'intégration bulbaire a lieu au sein des glomérules, qui concentrent les terminaisons axonales des OSNs et les dendrites apicales des neurones-relais.

#### ➤ La carte d'activation glomérulaire

Comme un glomérule reçoit les axones d'OSNs exprimant un même RO, l'activation d'un glomérule reflète l'activation d'un type de RO donné au sein de l'EO. Lorsqu'un odorant est détecté par l'EO, plusieurs RO sont impliqués donc plusieurs glomérules sont activés. Les glomérules activés fournissent alors une représentation topographique de l'odorant détecté. Nous avons vu que la distribution des RO était aléatoire au sein de la MO, néanmoins quatre grandes classes de RO ont été identifiées et définissent quatre zones d'expression le long de l'axe dorso-ventral (Ressler et al. 1993). Au sein du BO, les glomérules suivent également une répartition en quatre zones correspondant aux zones de la MO (Figure 11).

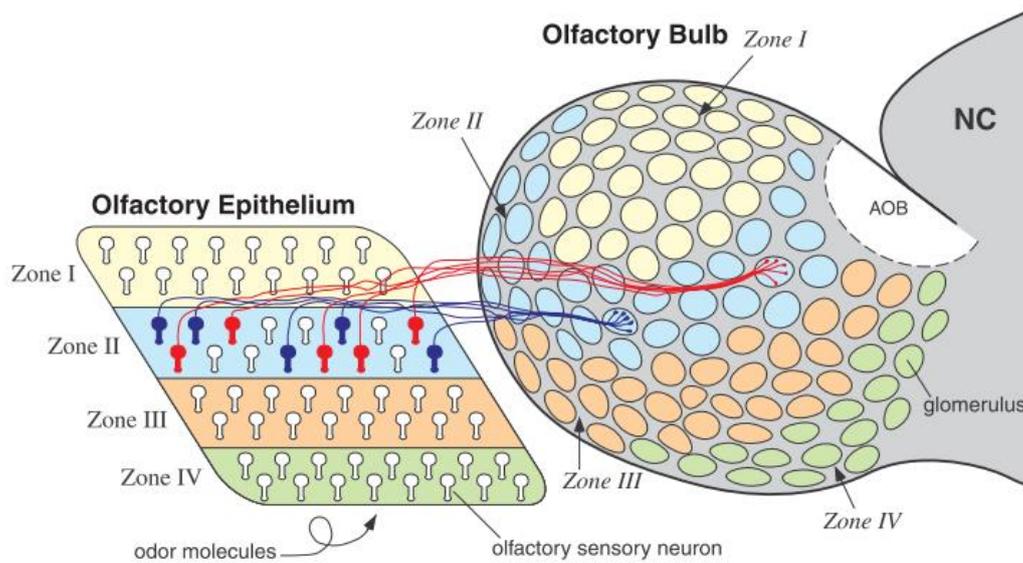


Figure 11 : Représentation schématique des connexions axonales entre l'épithélium olfactif et le bulbe olfactif

L'épithélium olfactif (EO) est divisé en 4 zones définies par l'expression des récepteurs olfactifs (RO). Les OSNs d'une zone de l'EO donnée projettent leur axone vers un même glomérule situé dans la zone du bulbe correspondante. NC : néocortex, AOB : bulbe olfactif accessoire. D'après Mori et al. 1999.

A l'intérieur du glomérule, les axones des OSNs forment des synapses excitatrices glutamatergiques avec les dendrites des neurones-relais (Berkowicz et al. 1994). Cependant, le signal n'est pas transmis tel quel des OSNs aux neurones-relais : il est d'abord modulé par les cellules JG.

Les axones des OSNs forment des synapses glutamatergiques excitatrices avec les dendrites des cellules PG, qui inhibent les OSNs en retour par libération de dopamine et de GABA (Ennis et al. 2001; Aroniadou-Anderjaska et al. 2000). Les cellules PG reçoivent une deuxième information via les synapses réciproques dendrodendritiques avec les cellules mitrales et à panache, toujours au sein du glomérule (Nagayama et al., 2014). Enfin, les axones des cellules PG exercent un rétrocontrôle négatif sur les cellules mitrales et à panache grâce à des synapses axo-dendritiques inhibitrices (Zou et al. 2009). Ainsi, un premier traitement du signal olfactif est réalisé par des phénomènes d'inhibitions intra-glomérulaires par les cellules PG.

Des inhibitions inter-glomérulaires ont également lieu grâce aux cellules sSA. Les cellules sSA activées par un glomérule projettent leur axone et forment des synapses excitatrices avec les cellules PG des glomérules adjacents, induisant l'inhibition des neurones-relais associés (Aungst et al. 2003). Enfin, les cellules ET renforceraient l'excitation des cellules PG et sSA au sein d'un même glomérule (Aungst et al. 2003; Nagayama et al. 2014).

L'activité des interneurons de la couche glomérulaire permettent d'augmenter le contraste entre les neurones-relais fortement activés et les neurones-relais voisins plus faiblement activés. Cette normalisation de l'entrée sensorielle par augmentation du ratio signal/bruit semble nécessaire à la bonne représentation de l'odeur indépendamment de sa concentration et au codage olfactif spatio-temporel (Aungst et al. 2003; Cleland et al. 2007).

Après ce contrôle de l'entrée de l'information olfactive au niveau des glomérules, le message olfactif se propage le long de la dendrite principale des neurones-relais et atteint leur corps cellulaire.

#### ➤ Les neurones-relais du BO

Les cellules mitrales et à panache projettent leur dendrite primaire vers un seul glomérule (Nagayama et al. 2014). Ainsi, l'activité d'un neurone-relais donné reflète l'activité d'un glomérule, et donc l'activation d'un même type de RO. Lorsque le signal olfactif arrive au niveau des corps cellulaires des cellules mitrales et des cellules à panache, celui-ci est conduit horizontalement sans atténuation le long des dendrites secondaires jusqu'à son inhibition locale par les GC au niveau de synapses réciproques dendro-dendritiques (Figure 12) (Xiong & Chen 2002). Une GC est connectée avec plusieurs neurones relais innervant des glomérules voisins. L'activation d'un neurone-relais entraîne donc sa propre rétro-inhibition ainsi que l'inhibition latérale des neurones-relais voisins, via l'action des GC (Isaacson & Strowbridge 1998).

La boucle d'interaction GC/neurones-relais permet la synchronisation de l'activité des neurones-relais activés et la genèse d'oscillations rythmiques au sein du BO, nécessaires au codage du signal olfactif (Bathellier et al. 2006; Lagier et al. 2007). En inhibant latéralement les cellules mitrales et à panache, les GC permettent donc un nouveau filtrage du signal olfactif qui normalise le signal de sortie du BO en fonction de l'intensité de l'entrée sensorielle (Mori & Shepherd 1994; Yokoi et al. 1995; Roland et al. 2016).

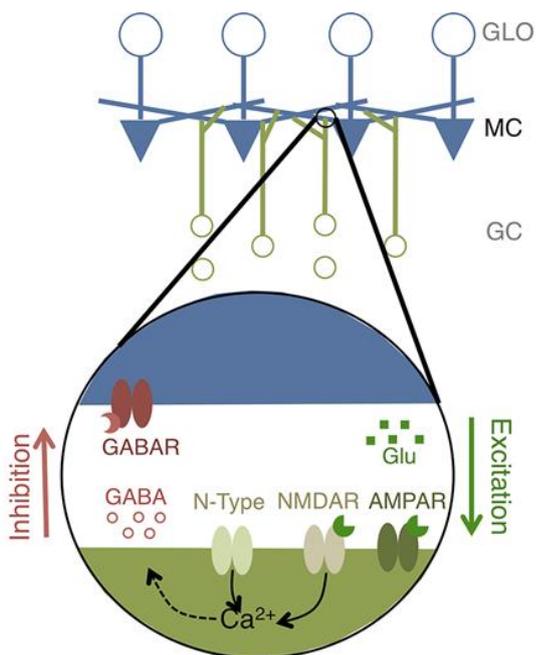


Figure 12 : Fonctionnement d'une synapse réciproque dendro-dendritique

Chaque cellule mitrale (MC) innervée est glomérule (GLO) et est connectée à plusieurs cellules granulaires (GC). Les MC excitent les GC par production de glutamate, qui peut se fixer sur différents types de récepteurs. La liaison aux récepteurs NMDAR provoque une entrée de  $\text{Ca}^{2+}$ . L'activation des canaux AMPAR entraîne l'entrée de  $\text{Na}^+$ , ce qui dépolarise localement la dendrite et provoque l'émission de potentiels d'action somatiques. Les canaux de type N sont alors activés et laissent également entrer le  $\text{Ca}^{2+}$  pour induire la libération des vésicules contenant l'acide  $\gamma$ -amino-butérique (GABA). En se fixant sur les récepteurs GABAR, le GABA produit par les GC inhibe les MC. D'après Osinski & Kay 2016.

Bien que les GC soient les principaux interneurons influençant l'activité des cellules mitrales et à panache, d'autres types d'interneurones situés dans la couche plexiforme externe et dans la couche granulaire seraient impliqués dans la modulation des neurones-relais du BO. Les interneurons de la couche plexiforme externe peuvent être distingués en 5 groupes : les cellules dites « larges » à axone court, les cellules de Van Gehuchten, les cellules de type multipolaire, les cellules internes à axone court et les cellules internes horizontales (Kosaka et al. 1994; Nagayama et al. 2014). Ces interneurons établissent des contacts réciproques avec les cellules mitrales, de manière similaire aux GC, et peuvent être activés par un large spectre d'odorants, suggérant un rôle dans le contrôle non odorant-spécifique de l'output du BO (Miyamichi et al. 2013; Kato et al. 2013). Les interneurons à axone court de la couche plexiforme externe joueraient également un rôle dans le recrutement des GC nouvellement générées et dans la mise en place des connexions appropriées entre GC et neurones-relais (Nagayama et al. 2014).

On trouve également des cellules à axone court dans la couche granulaire, ces cellules sont alors qualifiées de « profondes » (dSA). Les cellules dSA sont GABAergiques et modulent principalement l'activité des cellules PG et GC (Nagayama et al. 2014).

Ainsi, le message olfactif n'est pas seulement relayé par le BO, il est véritablement façonné et affiné par les interneurons locaux. Grâce aux nombreux types cellulaires très interconnectés dans le BO, l'intégration bulbaire constitue une étape clef du codage olfactif,

et conditionne les capacités de discrimination et de mémorisation des odeurs (Nagayama et al. 2014). Les neurones-relais du BO innervent ensuite des régions cérébrales où l'information olfactive sera intégrée avec les autres modalités sensorielles, avec l'expérience passée et avec les informations concernant l'état interne de l'animal, pour former la perception olfactive et induire une réponse comportementale à cette perception.

### 3. Traitement supérieur du signal olfactif

#### *a) Le cortex olfactif*

Les cellules mitrales et à panache projettent préférentiellement leur axone dans la région ventro-latérale. Les axones des neurones-relais du BO sont regroupés en un faisceau nerveux, le tractus olfactif latéral (LOT) (Castro et al. 1999), dont les branches collatérales atteignent le cortex olfactif.

Le cortex olfactif est un paléo-cortex organisé en trois couches laminaires et constitué d'ensemble de structures corticales, à savoir : le noyau olfactif antérieur, le tubercule olfactif, le cortex piriforme, plusieurs noyaux de l'amygdale corticale et le cortex entorhinal (Schwob & Price 1984; Haberly & Price 1977; Scott et al. 1980; Mainland et al. 2014) (Figure 13). Ces structures sont des centres d'intégration, de convergence et d'association de l'information olfactive. Le cortex olfactif établit ensuite des connections avec des structures non corticales telles que l'hippocampe, l'hypothalamus latéral, le cortex insulaire et l'OFC (Price et al. 1991; Astic et al. 1993; Wyss 1981; Mainland et al. 2014).

Les cellules principales du cortex olfactif sont les cellules pyramidales (Figure 14), qui reçoivent les afférences bulbaires et forment les synapses excitatrices au sein du cortex olfactif (vers les différentes structures qui le composent) et vers les autres aires olfactives. Le tubercule olfactif possède également des regroupements denses de petits neurones granulaires appelés « îlots de Calleja » (Fallon et al. 1978).

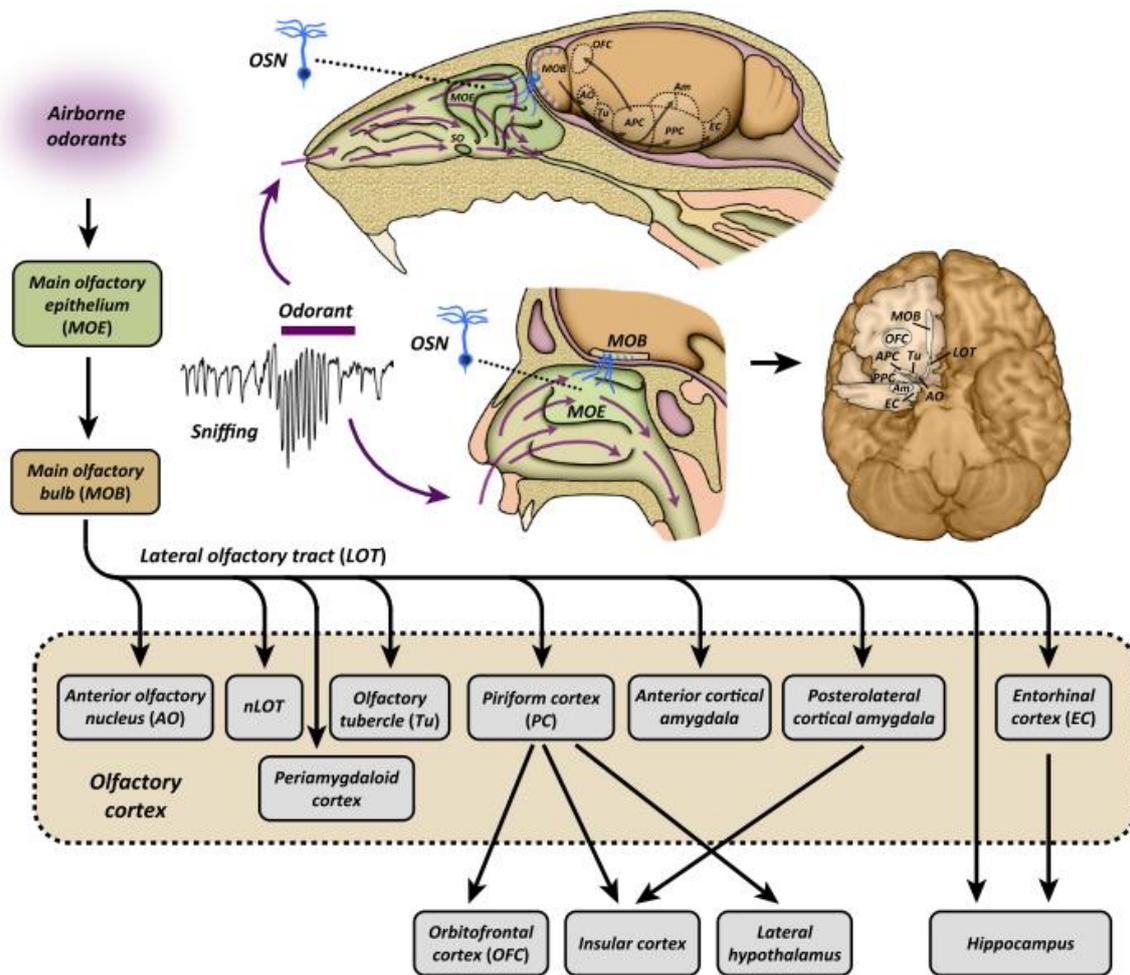


Figure 13 : Représentation simplifiée des projections du bulbe olfactif vers les structures cérébrales intégrant le message olfactif

Les neurones-relais du BO projettent via le tractus olfactif latéral (LOT) vers un ensemble hétérogène de structures secondaires regroupées sous le terme « cortex olfactif ». Ces structures projettent ensuite vers les structures olfactives tertiaires. D'après Mainland et al., 2014.

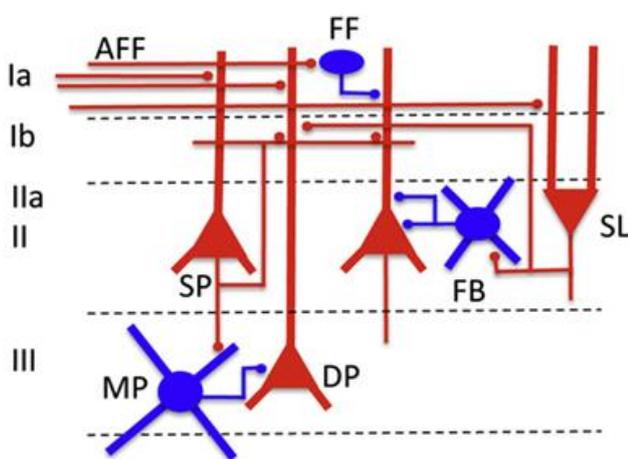


Figure 14 : Schématisation de la circuiterie neuronale au sein du cortex piriforme

La couche I est une couche plexiforme qui contient les dendrites apicales des cellules pyramidales (superficielles : SP et profondes : DP) ainsi que les terminaisons axonales des neurones-relais du BO (AFF). Les corps cellulaires des cellules pyramidales et des cellules semi-lunaires (SL) sont situés dans les couches II et III. Des interneurons inhibiteurs (en bleu) sont présents dans toutes les couches (FF, FB, MP). D'après Wilson & Sullivan 2011.

Dans le cortex piriforme, les stimuli odorants activent un nombre très limité de cellules pyramidales, plus faible que le nombre de neurones-relais activés dans le BO, et chacune de ces cellules pyramidales répond à quelques odorants seulement (Illig & Haberly 2003). Les cellules pyramidales reçoivent des synapses de plusieurs neurones-relais (Wilson & Sullivan 2011) et reçoivent donc l'information provenant de plusieurs glomérules et ainsi de plusieurs RO. Mais les cellules pyramidales émettent des potentiels d'action seulement si tous les neurones-relais qui l'innervent sont activés de manière synchronisée (Poo & Isaacson 2009). Cette forme de codage au sein des cellules pyramidales, par détection de la concomitance d'activation des neurone-relais qui l'innervent, permet d'augmenter la discrimination entre des odorants structurellement très proches qui activeraient des populations de glomérules similaires (Su et al. 2009).

La synchronisation des neurones-relais du BO a lieu sous forme d'oscillations rythmiques générées par les interactions locales dendro-dendritiques entre les cellules mitrales et à panache et les cellules GC au sein du BO (Kashiwadani et al. 1999; Isaacson & Strowbridge 1998). Ces oscillations seraient également liées à l'activité respiratoire (Buonviso et al. 2006).

Au sein du cortex olfactif, les différentes structures semblent avoir des fonctions plus ou moins définies.

Le cortex piriforme constitue un véritable centre d'intégration, de convergence et d'association de l'information olfactive en provenance du BO avec celles issues d'autres systèmes sensoriels, des systèmes limbiques ou encore moteurs (Datiche et al. 1996; Haberly 2001). Il contribuerait entre autres à la reconnaissance de l'odeur et à la mémoire olfactive et serait très impliqué dans les mécanismes d'apprentissages olfactifs (Mouly et al. 2001; Kadohisa & Wilson 2006; Barnes et al. 2008; Cohen et al. 2008; Li et al. 2008).

De par sa localisation, le noyau olfactif antérieur permet la connexion entre les BO droit et gauche et assure ainsi un transfert réciproque d'informations spécifiques, nécessaires à la mémorisation olfactive (Yan et al. 2008) et à la localisation spatiale des sources odorantes (Kikuta et al. 2010). Le noyau olfactif antérieur possède également des neurones à vasopressine, dont la signalisation est impliquée dans le traitement des odeurs sociales (Wacker et al. 2011).

Les cellules du tubercule olfactif, concentrées dans les îlots de Calleja, ciblent principalement l'aire tegmentale ventrale (Fallon 1983), qui est une structure clef du système de la récompense. Le tubercule olfactif est ainsi impliqué dans les comportements motivés (Gadziola & Wesson 2016). L'activité du tubercule olfactif dépendrait de l'état d'éveil sensoriel, d'attention, et contribuerait également à la discrimination des odeurs, à la modulation des réponses odorantes au sein du BO et à l'association des informations provenant de différentes modalités sensorielles (Wesson & Wilson 2011).

Le système limbique regroupe des structures jouant un rôle dans le comportement, les émotions et la mémoire. Parmi ces structures, l'amygdale est considérée comme étant le centre des émotions. Les noyaux amygdaliens du cortex olfactif seraient responsables des comportements innés médiés par les odeurs (Root et al. 2014) et semblent traiter la dimension affective et émotionnelle de l'odeur (Zald & Pardo 1997; Lundström et al. 2011). L'amygdale est impliquée dans la formation de la mémoire olfactive chez la brebis, qui lui permet de reconnaître son propre petit après la naissance et de rejeter tout autre petit étranger (Keller et al. 2004; Corona & Lévy 2015). L'amygdale est également une structure centrale dans l'acquisition des aversions alimentaires et potentialise la mise en mémoire des odeurs associées à des émotions fortes, négatives ou positives (Bermudez-Rattoni et al. 1983; Sevelinges et al. 2004; Sevelinges et al. 2009).

Le cortex entorhinal fait également partie des structures limbiques et serait impliqué dans la modulation du codage des odeurs en fonction de l'expérience et de l'état physiologique, ainsi que dans les processus d'apprentissages associatifs (Xu & Wilson 2012; Igarashi et al. 2014).

Les structures du cortex olfactif innervent ensuite d'autres structures cérébrales pour une intégration multimodale du message olfactif.

### *b) Les structures olfactives tertiaires*

L'hippocampe est une structure sous-corticale appartenant au système limbique, qui reçoit des projections olfactives depuis le cortex entorhinal et directement depuis le BO via le LOT. Cette structure clef de la mémoire est impliquée dans les apprentissages olfactifs (Otto et al. 1991) et dans le traitement du contexte de peur associé à une exposition aux odeurs de prédateurs (Takahashi et al. 2014). La mémoire olfactive serait plutôt associative qu'absolue

puisque la mise en mémoire des odeurs se fait généralement par association à un contexte particulier.

L'hypothalamus latéral est innervé par le cortex piriforme, mais également par le noyau olfactif antérieur, le cortex entorhinal et les noyaux amygdaliens (Price et al. 1991). L'information olfactive ainsi reçue contribuerait au rôle clef de l'hypothalamus latéral dans la régulation du comportement alimentaire et de l'homéostasie énergétique en fonction de l'état nutritionnel de l'individu (Riera & Dillin 2016). L'hypothalamus latéral serait éventuellement le siège du phénomène de rassasiement sensoriel spécifique (Burton et al. 1976; Rolls et al. 1980; Rolls et al. 1986), qui permet d'anticiper l'arrêt de la prise alimentaire et constitue la base de la diversité alimentaire.

Chez l'homme, l'activité du cortex insulaire est plus forte lorsqu'elle est provoquée par des stimuli déplaisants que par des stimuli plaisants, que les stimuli soient directement des odeurs ou des émotions induites par les odeurs (Bensafi et al. 2007). Ainsi le cortex insulaire pourrait jouer un rôle dans le traitement des odeurs déplaisantes. Par ailleurs, le cortex insulaire, en association avec d'autres structures (cortex piriforme et OFC) semblerait impliqué dans la représentation mentale des odeurs et dans leur mise en mémoire sous forme de catégories (Qu et al. 2016).

L'OFC est le siège de la prise de décision consciente et utiliserait les informations provenant du cortex olfactif, en particulier l'aspect motivationnel associé à l'odeur et encodé au niveau de l'amygdale, pour initier les comportements induits par les odeurs (Schoenbaum et al. 1999). Ainsi, une représentation mentale de l'odeur et de sa signification serait formée au niveau de l'OFC (Illig 2005). L'OFC participerait également au phénomène de rassasiement sensoriel spécifique (O'Doherty et al. 2000). Enfin, l'OFC constitue la principale source d'information descendante vers le cortex piriforme et encoderait la valeur prédictive de l'odeur, c'est-à-dire l'apprentissage et la mémorisation des conséquences associées à une perception odorante, jouant ainsi un rôle dans les comportements d'anticipation (Schoenbaum & Roesch 2005).

Ainsi, la diversité des structures impliquées dans le traitement de l'information olfactive contribue à la perception consciente ou inconsciente des odeurs, qui varie en fonction de l'expérience et de l'état interne de l'animal.

Le chemin du message olfactif de l'EO au BO, puis aux structures cérébrales corticales et non-corticales, constitue la voie olfactive ascendante. Pour former complètement la perception odorante, une seconde voie dite descendante, en provenance des structures cérébrales olfactives et non-olfactives, est impliquée. Il s'agit principalement d'une voie de régulation de l'activité du BO.

### *c) Les afférences centrales sur le BO*

De manière générale, les structures qui reçoivent des projections depuis le BO l'innervent en retour. Le BO reçoit ainsi des projections centrifuges depuis le cortex olfactif, en particulier depuis le noyau olfactif antérieur, le cortex piriforme et le cortex entorhinal (De Castro 2009). Le BO est également particulièrement innervé par l'hypothalamus (Peyron et al. 1998; Nambu et al. 1999).

Ces afférences centrales modulent l'activité du bulbe et influence la perception olfactive et peuvent être classées en deux grandes catégories selon leur provenance :

- Les projections depuis les structures olfactives et limbiques, principalement glutamatergiques (Mouret et al. 2009).
- Les projections depuis les autres centres neuromodulateurs : noradrénergiques depuis le locus coeruleus, cholinergiques depuis le télencéphale basal ainsi que la branche horizontale de la bande de Broca, et sérotoninergiques depuis les noyaux dorsaux et médians du raphé (Lazarini & Lledo 2011).

La plupart des fibres centrifuges ciblent les GC et modulent l'inhibition dendro-dendritique des cellules mitrales et à panache (Macrides et al. 1981; Strowbridge 2009; Mouret et al. 2009), à l'exception des fibres sérotoninergiques qui atteignent les PG et modulent ainsi l'entrée sensorielle dans le BO au niveau des terminaisons axonales des OSNs (Petzold et al. 2009).

Ces projections centrifuges permettent de façonner le signal olfactif de manière dynamique en prenant en compte les dimensions spatio-temporelles et contextuelles de l'exposition odorante, l'état interne de l'organisme et l'expérience odorante antérieure, dans le but de donner du sens à la perception sensorielle (Kay & Laurent 1999; Buonviso & Chaput 1999; Martin et al. 2004; Restrepo et al. 2009). La suppression de ces projections centrifuges affecte ainsi certaines facettes de la perception odorante et les comportements médiés par

l'olfaction, en particulier la discrimination et la mémoire olfactive, ainsi que l'apprentissage olfactif associatif (Guérin et al. 2008; Sullivan et al. 1992; Linster et al. 2001; Mandairon et al. 2006).

L'interaction entre les voies olfactives ascendante et descendante permet une intégration multi-modale du message olfactif à l'origine de la perception olfactive globale.

La perception d'une odeur peut être décrite selon 3 caractéristiques principales : son identité ou sa qualité, son intensité et sa valence ou valeur hédonique. L'identité et l'intensité sont des caractéristiques plutôt objectives, tandis que la valence est très subjective et dépend de nombreux facteurs non-cognitifs, inconscients et environnementaux.

Dans le paragraphe suivant nous allons décrire rapidement comment sont encodées ces 3 caractéristiques au sein du système olfactif.

## IV. Le codage des odeurs par le système olfactif

Les signaux odorants chimiques détectés par les RO sont transformés en séquences de potentiels d'action (PA) par les OSNs. Les PA étant des signaux digitaux ; leur nombre, fréquence et distribution parmi les neurones constituent l'ensemble des informations disponibles pour le système nerveux central.

### 1. Identité de l'odeur

L'identité d'un odorant est encodée dès l'étape d'activation des RO au sein de l'EO. La plupart des RO peuvent être activés par plusieurs odorants et réciproquement, un odorant peut activer plusieurs types de RO (Duchamp-Viret et al. 1999). Les RO répondant à de nombreux odorants sont dits à large spectre, les RO répondant à peu d'odorants sont dits à spectre étroit ou réduit. Il existe un codage combinatoire pour l'identification des odorants au niveau périphérique (Figure 15) : l'activation d'une combinaison particulière de RO constitue une représentation primaire de l'odorant (Malnic et al. 1999). Ainsi, c'est la distribution des PA parmi les OSNs qui signe l'identité odorante.

Comme les OSNs exprimant un même RO projettent leurs axones vers les mêmes glomérules, le pattern d'activation des RO est conservé au niveau de la couche glomérulaire du BO. Ainsi, l'identité de l'odorant est codée au sein du BO par la combinaison des glomérules activés, formant une carte d'activation spécifique de l'odorant visualisable par IMR fonctionnelle (Xu et al. 2003; Schafer et al. 2006).

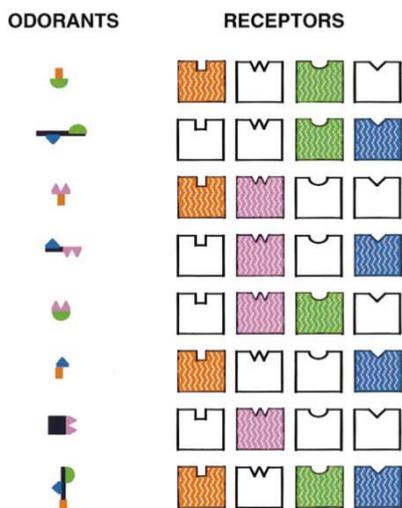


Figure 15 : Schématisation du codage combinatoire des odorants

Chaque molécule odorante (représentées à gauche) peut se fixer sur plusieurs récepteurs olfactifs (représentés à droite). Réciproquement, chaque récepteur olfactif peut être activé par plusieurs molécules odorantes. Mais chaque molécule génère un motif d'activation de récepteurs unique qui permet son codage. D'après Malnic et al. 1999.

Les mélanges d'odorants semblent induire des activations glomérulaires prédictibles en fonction des cartes glomérulaires des composés odorants présents dans le mélange (Belluscio & Katz 2001). En effet dans notre environnement, les odeurs sont bien souvent le résultat de mélanges complexes de molécules odorantes. La perception de ces mélanges peut alors se faire selon deux modes : la perception élémentaire du mélange, c'est-à-dire la reconnaissance de chaque composé présent ; ou la perception configurationnelle du mélange, c'est-à-dire comme une seule odeur, alors appelée « accord olfactif » (Schneider et al. 2016). Par exemple, l'odeur de fraise associée à l'odeur de caramel donne l'odeur d'ananas.

## 2. Intensité de l'odeur

L'intensité perçue d'une odeur est en partie dépendante de la concentration en molécules odorantes qui entrent dans la cavité nasale. En l'absence de stimulus odorant, la fréquence basale d'émission des PA est faible (0,05 à 3 Hz) (Duchamp-Viret et al. 2000). En présence d'odeur, le nombre et la fréquence d'émission des PA augmentent avec la concentration odorante jusqu'à des concentrations intermédiaires, puis diminue pour les concentrations saturantes. La latence pour générer le premier PA varie également en fonction de la concentration, avec des latences plus courtes lorsque la concentration augmente (Ghatpande & Reisert 2011; Rospars et al. 2000).

L'intensité de l'odeur peut donc être codée au niveau périphérique par le nombre, la fréquence et la latence d'émission des PA par les OSNs.

Au niveau du BO, si l'on enregistre les courants entrant dans les glomérules par imagerie calcique pré-synaptique sur les terminaisons axonales des OSN, l'amplitude de la réponse glomérulaire augmente et la latence diminue quand la concentration en odorant augmente (Wachowiak & Cohen 2001; Spors 2006). Ces modifications s'effectuent indépendamment dans chaque glomérule et fournissent une représentation de l'intensité des odorants détectés par chaque type de RO.

La plus petite intensité d'odeur perçue constitue le seuil de détection odorante. Cette capacité de détection serait liée à la finesse des projections axonales et à l'organisation synaptique au sein des glomérules (Mainland et al. 2014).

### 3. Valence de l'odeur

La valeur hédonique d'une odeur peut être définie comme son appréciation plaisante ou déplaisante. Chez l'animal, il est difficile d'évaluer le caractère agréable d'une odeur, on parlera plutôt d'attractivité ou d'aversion pour une odeur.

Il semble exister au sein du BO une régionalisation des glomérules qui traiterait en partie la valeur hédonique des odeurs. Les odorants attractifs activeraient plutôt des glomérules situés dans la partie ventrale du BO (Kermen et al. 2016), tandis que les odorants aversifs activeraient des glomérules dorsaux. En effet, suite à une modification génétique, des souris ne présentant pas de glomérules dans la région dorsale du BO ne montrent pas de réaction d'aversion envers l'acide 2-méthylbutyrique (molécule odorante produite par la nourriture avariée) et la TMT (odeur de prédateur), bien qu'elles soient toujours capables de détecter ces odeurs (Kobayakawa et al. 2007). Or ces réactions d'aversion se manifestent de manière innée chez les souris sauvages. De plus, les TAARs détectent de nombreux odorants aversifs et projettent vers la partie dorsale du BO (Pacífico et al. 2012). A l'inverse, les glomérules situés dans la partie ventrale du BO sont plutôt activés par les odeurs sociales connues pour être attractives (Xu et al. 2005).

Il en est de même pour les odeurs non biologiques : leur attractivité innée est représentée le long de l'axe anatomique dorso-ventral du BO, mais cette régionalisation peut être modulée par manipulation des circuits neuronaux locaux (Kermen et al. 2016).

Le codage de la valence des odeurs implique également les structures olfactives cérébrales telles que l'amygdale (Root et al. 2014), le cortex piriforme (Zelano et al. 2007) et le tubercule olfactif (FitzGerald et al. 2014, Midroit 2018).

La valence d'une odeur peut être innée ou acquise. Les comportements stéréotypés de fuite face à une odeur de prédateur chez des animaux de laboratoire qui n'ont jamais été en contact à l'environnement extérieur (Ferrero et al. 2011), le pouvoir attractif du lait maternel (Coureaud et al. 2001), et la conservation des préférences spontanées pour de nouveaux odorants entre l'homme et la souris (Mandairon et al. 2009), sont des phénomènes qui suggèrent une composante innée à la valeur hédonique de certaines odeurs. Mais l'expérience peut moduler cette valence, c'est d'ailleurs un principe utilisé lors des tests comportementaux reposant sur un apprentissage associatif : une odeur initialement neutre va être associée à un stimulus à renforcement positif (récompense alimentaire) ou négatif (absence de récompense, choc électrique). Pour certaines odeurs non biologiques, la valeur hédonique initiale est neutre, et l'attribution du caractère plaisant ou déplaisant dépend du contexte dans lequel elles ont été senties pour la première fois, à la manière d'un apprentissage associatif (Zelano et al. 2007; Bensafi et al. 2007; Perry et al. 2016).

A ces 3 caractéristiques principales pour décrire une odeur s'ajoutent des aspects secondaires comme la nouveauté du stimulus ou sa signification.

La perception olfactive ne constitue pas un phénomène figé. Au contraire elle évolue dans le temps en fonction du contexte environnemental et de l'état interne de l'organisme grâce à des mécanismes de plasticité neuronale. Dans cette dernière partie, nous allons décrire les étapes clés du développement du système olfactif et mettre en évidence la plasticité au sein de l'EO et du BO.

## V. Développement et plasticité du système olfactif

### 1. La construction du système olfactif

L'hypothèse principale pour expliquer comment le système olfactif se forme est celle d'une « proto-carte » qui définirait le développement de l'EO, du BO et du cortex olfactif de manière indépendante et simultanée, à travers un programme développemental intrinsèque à chaque structure (De Castro 2009). Une fois les différentes structures générées, la

finalisation du développement de chaque structure se déroule sous l'influence des autres structures qui lui sont connectées.

#### *a) Mise en place au cours du développement embryonnaire*

L'EO se forme à partir de la placode olfactive où les premiers signes de neurogenèse apparaissent aux alentours du jour embryonnaire 9.5 (E9.5) (De Castro 2009). Les axones des OSNs sont ensuite rapidement identifiables, formant les nerfs olfactifs entre E11 et E12 et pénétrant dans le BO à partir de E13.5 (De Castro 2009). Le guidage axonal est observé dès E15.5 (Potter et al. 2001) et les axones des OSNs se regroupent dans les zones qui deviendront les glomérules à partir de E17.5 (De Castro 2009).

Vers E14, les cils commencent à apparaître au niveau des boutons dendritiques des OSNs (Cuschieri & Bannister 1975), tout comme l'expression des composants de la cascade de transduction olfactive (RO,  $G_{olf}$ , ACIII, CNG) (Saito et al. 1998; Schwarzenbacher et al. 2005). Ainsi, une réponse odorante des OSNs est possible *in utero* chez l'embryon (Gesteland et al. 1982; Lam & Mombaerts 2013).

Dans le BO, les premiers neurones sont générés à partir de E11 et à partir de E10 dans le cortex olfactif (De Castro 2009). La totalité des neurones-relais est générée avant la naissance : les cellules mitrales sont produites entre E10 et E13 tandis que les cellules à panache sont formées un peu plus tardivement, entre E13 et E16 (Hinds 1968; Imamura et al. 2011).

#### *b) Développement postnatal*

La complexité des circuits neuronaux du système olfactif est ensuite élaborée tout au long de la période de maturation postnatale.

Entre la naissance et l'âge adulte (10-12 semaines), la surface totale de la MO est multipliée par 10 environ, tout comme le volume total du BO (Pomeroy et al. 1990).

L'apparence finale des glomérules est un processus principalement postnatal qui s'étend de E18.5 à PND14.5 (Potter et al. 2001; St John & Key 2001; St. John et al. 2002). Le nombre de glomérules augmente pendant les premières semaines de vie chez le rongeur, sans suppression apparente des populations neuronales initiales (LaMantia & Purves 1989). L'animal néonatal possède environ 400 glomérules, pour 1700 à l'âge adulte, avec un

diamètre et un nombre de synapses également plus grands que chez le nouveau-né (Pomeroy et al. 1990).

Contrairement aux neurones-relais, les GC sont principalement générées pendant la période postnatale (Hinds 1968). Les GC sont produites à partir de progéniteurs neuronaux au niveau de la zone subventriculaire (SVZ) et migrent le long du courant migratoire rostral (RMS) pour atteindre le BO où elles se différencieront (Lois & Alvarez-Buylla 1994). Les différents types de GC sont dus à la diversité des sites de production au sein de la SVZ : les cellules GC superficielles proviennent préférentiellement de la partie dorsale de la SVZ, alors que les cellules GC profondes sont plutôt produites dans la partie ventrale (Merkle et al. 2007).

Les différentes structures du système olfactif acquièrent une maturité complète d'ici l'âge de 3 semaines chez la souris (Pomeroy et al. 1990; Zou et al. 2004). L'OMP constitue un marqueur des OSNs matures, exprimé par les cellules de l'EO, de l'OS, du GG et de l'OVN (Fuss et al. 2005). Le système olfactif mature subit ensuite des phénomènes continus de renouvellement cellulaire et d'intégration de neurones nouvellement formés, à l'origine de la plasticité de la perception olfactive.

## 2. La plasticité du système olfactif

### *a) Le renouvellement continu de l'épithélium olfactif*

Contrairement à la plupart des cellules neuronales des vertébrés, les OSNs sont continuellement renouvelés à l'âge adulte et régénérés après altération de l'EO. Ce phénomène présente une importance considérable compte tenu de la vulnérabilité de l'EO, en position non protégée dans la cavité nasale et soumis à tous types d'agressions par la voie aérienne. En projetant directement vers le système nerveux central, les OSNs constituent par ailleurs une porte d'entrée potentielle pour le transport d'agents infectieux, virus ou bactéries, depuis l'environnement externe (Owen et al. 2009). Pour contrebalancer cette vulnérabilité et maintenir un EO fonctionnel, une importante neurogenèse a lieu tout au long de la vie.

Les cellules basales de l'EO ont été identifiées comme les éléments précurseurs des OSNs (Moulton 1974). En effet, les cellules basales prolifèrent continuellement, et 90 % des

produits de division des cellules basales migrent vers le compartiment de l'EO qui contient les corps cellulaires des OSNs. Les 10 % restants semblent servir à former de nouvelles cellules basales. Une fois la division cellulaire terminée, il faut environ 7-8 jours aux OSNs pour devenir matures ; la maturité des OSNs étant définie par l'apparition de l'expression de l'OMP (Kondo et al. 2010; Miragall & Graziadei 1982).

Pour que l'EO soit un tissu en renouvellement et non en expansion, il doit exister des mécanismes de dégénérescence cellulaire. Des macrophages sont présents au sein de l'EO pour la phagocytose des OSNs matures (Graziadei & Graziadei 1979). Les cellules de soutien semblent également capables de phagocyter les OSNs en dégénérescence (Suzuki et al. 1996).

Ainsi, un turnover complet de l'EO est assuré en 30 jours environ (Graziadei & Graziadei 1979). Les mécanismes déclencheurs du renouvellement ne sont pas entièrement connus. Il est possible que l'accumulation des odorants, composés chimiques potentiellement toxiques, soit à l'origine du vieillissement ou de l'altération des OSNs, provoquant leur dégradation. Les OSNs en dégénérescence pourraient alors libérer des substances qui déclencheraient la différenciation des nouveaux éléments à partir des cellules basales (Graziadei & Graziadei, 1979).

Plusieurs facteurs de croissance impliqués dans la régénération de l'EO ont été identifiés : les facteurs de croissance transformants (TGF- $\alpha$  et TGF- $\beta$ ), le facteur de croissance des fibroblastes FGF2 (Schwob 2002). Ces facteurs agissent selon des mécanismes différents pour assurer d'une part le renouvellement homéostatique « normal » de l'EO, et d'autre part la régénération du tissu après un dommage (Konkimalla & Tata 2017). L'EO peut en effet être endommagé lorsque le tissu est directement exposé à un agent toxique (Harding et al. 1978; Burd 1993) ou lorsque les connexions axonales vers le BO sont altérées (Harding et al. 1977; Costanzo 1985).

Cette capacité de renouvellement et de régénération est caractéristique de l'EO et permet de maintenir l'intégrité et la fonctionnalité du tissu malgré les atteintes possibles au vu de sa position.

#### *b) La neurogenèse adulte dans le bulbe olfactif*

A l'âge adulte, la SVZ génère encore des neuroblastes qui migrent le long du RMS et atteignent le BO pour se différencier en interneurones (Lois & Alvarez-Buylla 1994; Whitman

& Greer 2009). Environ 95 % des neurones nouvellement formés se différencient en GC, moins de 3 % deviennent des PG (Lledo et al. 2006) et une très faible portion forme des JG glutamatergiques (sSA) (Brill et al. 2009). La moitié des neurones formés à l'âge adulte dégénèrent au cours du processus de branchement dendritique et synaptique, qui a lieu entre 15 et 40 jours après la création d'un neurone (Winner et al. 2002; Lemasson et al. 2005; Kelsch et al. 2008; Mouret et al. 2008). Les neurones qui ne dégénèrent pas lors de cette période de mort cellulaire deviendront fonctionnels et indiscernables des neurones pré-existants pendant plusieurs mois (Mizrahi 2007; Mary C. Whitman & Greer 2007; Grubb et al. 2008).

La formation des synapses entre les neurones nouvellement formés et les neurones-relais du BO serait médiée par les afférences centrifuges (Panzanelli et al. 2009; M. C. Whitman & Greer 2007), et par l'expérience sensorielle (exposition odorante passive ou apprentissage olfactif) (Lazarini & Lledo, 2011).

Ces neurones formés à l'âge adulte jouent un rôle crucial dans la perception olfactive et les comportements qui en découlent (pour revue voir Lazarini & Lledo 2011 et Kageyama et al. 2012). Ils permettent notamment le développement de capacités de discrimination très fines (Belnoue et al. 2011; Gheusi et al. 2000), l'établissement d'une mémoire olfactive à court et long terme ainsi que toute forme d'apprentissage olfactif (Rochefort et al. 2002; Rochefort & Lledo 2005; Lazarini et al. 2009; Breton-Provencher et al. 2009; Romero-grimaldi et al. 2006; Sultan et al. 2010; Moreno et al. 2009).

La perception odorante repose donc sur des circuits neuronaux complexes, qui sont modulés en fonction du contexte environnemental, de l'expérience et de l'état interne de l'animal, dans le but d'induire une réponse comportementale adaptée. Nous avons en particulier souligné un rôle du système olfactif dans la régulation du comportement alimentaire. Or pour réguler les aspects du comportement alimentaire en adéquation avec les besoins nutritionnels de l'organisme, le système olfactif doit être informé de l'état interne métabolique. Il s'avère que les différentes structures olfactives sont sous influence métabolique ; cette caractéristique fait l'objet de la troisième et dernière partie des données bibliographiques de ce manuscrit.

# Partie 3 : L'olfaction sous influence métabolique

---

Au XIX<sup>ème</sup> siècle, le physiologiste Claude Bernard a introduit le terme d'homéostasie, définit comme le maintien d'un paramètre clef à une valeur bénéfique pour l'organisme. Par exemple, la température corporelle est maintenue autour de 37 °C, qui est la température optimale de fonctionnement des organes. De la même manière, le poids corporel et les réserves énergétiques de l'organisme sont régulés. L'organisme doit constamment faire face à des apports énergétiques, provenant de l'alimentation, et à des dépenses dues à l'activité physique et au métabolisme basal. Ainsi, il existe un système de régulation, impliquant notamment l'hypothalamus, permettant de prendre en charge les nutriments, de les transformer, de les distribuer au sein de l'organisme, de les stocker, et de mobiliser les réserves énergétiques.

La régulation de l'homéostasie énergétique se fait grâce à l'action de nombreux peptides et hormones, à même de moduler également le système olfactif. Palouzier-Paulignan et collaborateurs exposent dans une revue très complète l'action des facteurs métaboliques sur l'olfaction (Palouzier-Paulignan et al. 2012). Nous allons reprendre dans cette partie les caractéristiques principales de l'influence métabolique que connaît le système olfactif.

## I. Modulation des structures du système olfactif par les peptides et hormones du métabolisme

Les facteurs métaboliques impliqués dans la régulation de l'homéostasie énergétique peuvent être classés en deux catégories suivant leur action sur la prise alimentaire : les facteurs orexigènes, qui favorisent l'ingestion de nourriture ; et les facteurs anorexigènes qui diminuent la prise alimentaire. Ces facteurs agissent sur le système olfactif via des récepteurs présents au niveau de la MO mais également du BO et dans les structures supérieures liées à l'olfaction.

## 1. Les facteurs orexigènes

### *a) La ghréline*

La ghréline est principalement produite par l'estomac et le tractus gastro-intestinal (Kojima et al. 1999; Date et al. 2011). La teneur en ghréline circulante augmente avant un repas puis diminue en mangeant, suggérant un rôle de la ghréline dans la prise alimentaire et plus particulièrement dans l'initiation du repas (Cummings 2001; Wren et al. 2001).

Le récepteur à la ghréline (GHSR-1a) est présent dans le bulbe olfactif (couche glomérulaire, couche des cellules mitrales et couche granulaire) et dans le cortex piriforme (Tong et al. 2011). La ghréline influence la fonction olfactive chez le rongeur et chez l'homme en augmentant le comportement exploratoire de flairage et en améliorant la détection des odeurs (Tong et al. 2011).

### *b) Les orexines*

Les orexines A et B (également appelées hypocrélines) sont des neuropeptides synthétisés dans l'hypothalamus et sont impliquées dans la régulation neuro-endocrine de plusieurs fonctions dont l'alternance sommeil/éveil, les mécanismes de récompense, et la prise alimentaire (Tsujino & Sakurai 2009). Les orexines stimulent la prise alimentaire lorsqu'elles sont injectées de manière aiguë dans le cerveau (Sakurai et al. 1998), mais ne modifient ni la prise alimentaire ni le poids corporel lors d'infusions chroniques (Haynes et al. 1999).

Les orexines et leurs récepteurs sont présents dans tous les niveaux du système olfactif, de la muqueuse nasale au cortex piriforme et à l'amygdale. Le message olfactif peut ainsi être modulé par les orexines synthétisées au niveau central dans le bulbe et le cortex olfactifs, et par des peptides synthétisés localement dans la MO (Caillol et al. 2003). Plus précisément, l'orexine A peut moduler l'activité des cellules mitrales du BO (Apelbaum et al. 2005; Hardy et al. 2005). Lorsqu'elle est injectée à des rats de manière intra-cérébro-ventriculaire (ICV), l'orexine A augmente l'activité neuronale dans toutes les couches du BO (Prud'homme et al. 2009).

L'administration d'orexine chez le rat est associée à une augmentation de la détection olfactive, similaire au changement de perception olfactive observée chez le rat à jeun (Julliard et al. 2007), et à une augmentation de l'exploration des odeurs (Prud'homme et al. 2009).

### *c) Le neuropeptide Y*

Le NPY est principalement synthétisé dans l'hypothalamus, le thalamus, l'amygdale, l'hippocampe, le noyau du tractus solitaire et le locus coeruleus (Chronwall et al. 1985; Meister 2007; Palkovits 1992). Après un repas, les taux de NPY augmentent dans l'hypothalamus où le peptide joue un rôle important dans la régulation de la prise alimentaire et de la dépense énergétique (Nguyen et al. 2011).

Dans le système olfactif, le NPY a été identifié dans la MO, principalement dans les cellules non neuronales, où il agirait via les récepteurs Y1 pour induire la prolifération neuronale (Hansel et al. 2001; Doyle et al. 2008) et augmenter la réponse aux odorants OSNs en condition de jeûne (Negroni et al. 2012). Le NPY est également présent dans le BO et agirait via Y2 pour réduire la neurotransmission excitatrice (via le glutamate) entre les neurones du BO (Blakemore et al. 2006).

### *d) Les endocannabinoïdes*

Les cannabinoïdes endogènes sont des dérivés lipidiques synthétisés par clivage de phospholipides au niveau des membranes post-synaptiques (Grotenhermen 2004). Les endocannabinoïdes participent au contrôle hypothalamique de la prise alimentaire médié par la leptine (Marzo et al. 2001).

Le récepteur CB1 se situe principalement au sein du système nerveux. Il est présent dans les cellules péri-glomérulaires du BO, dans le cortex olfactif et dans les structures secondaires olfactives comme l'hippocampe et l'amygdale (Mailleux & Vanderhaeghen 1992; Matsuda et al. 1993; Tsou et al. 1998; Hermann et al. 2002).

Il a récemment été suggéré que le système endocannabinoïde contrôlerait la prise alimentaire via des modulations olfactives. Les cannabinoïdes sont en effet capables de diminuer l'activité glutamatergique des projections centrifuges au niveau du BO, ce qui entrainerait une augmentation de la détection des odeurs alimentaires et favoriserait de manière proportionnelle la prise alimentaire chez la souris (Soria-gómez et al. 2014).

### *e) Les opioïdes endogènes*

Les opioïdes endogènes sont synthétisés à la fois dans le système nerveux périphérique et central. Trois composés ont été identifiés chez l'animal : l'endorphine, la dynorphine et

l'énképhaline. Ces peptides sont produits à partir de précurseurs sous forme de pro-hormones et sont impliqués dans de nombreuses fonctions telles que la nociception, la mémoire et la prise alimentaire (pour revue, voir [Bodnar & Klein 2006](#)). En particulier, les opioïdes endogènes augmentent la consommation de sucre et de graisses et participent aux mécanismes de récompense alimentaire ([Olszewski et al. 2011](#)).

Au sein du système olfactif, on retrouve ces peptides dans les couches glomérulaire, plexiforme externe et granulaire du BO, ainsi que dans le cortex olfactif ([Laux et al. 2011](#)). Dans ces structures, on trouve également les trois types de récepteurs aux opioïdes (mu, delta et kappa) ([Mansour et al. 1994](#)).

Au niveau fonctionnel, ce système opioïde a été montré comme étant un modulateur de l'apprentissage olfactif et un consolidateur des préférences olfactives précoces chez le rat ([Shide & Blass 1991](#); [Kinsley et al. 1995](#); [Roth & Sullivan 2001](#); [Roth & Sullivan 2003](#)).

## 2. Les facteurs anorexigènes

### *a) L'insuline*

L'insuline est libérée par les cellules  $\beta$  du pancréas de manière glucose-dépendante lors de l'ingestion d'un repas. L'insuline est également produite au cours de la phase céphalique de la digestion, qui comprend des mécanismes physiologiques déclenchés par la présentation d'un aliment. C'est une hormone anabolisante qui permet l'absorption du glucose par les tissus et donc son stockage sous forme de glycogène ou de triglycérides.

Dans la MO, l'insuline semble provenir de la circulation périphérique, comme c'est le cas pour les autres tissus périphériques, mais le mécanisme de transport depuis le sang vers la MO n'est pas entièrement compris. Une production locale d'insuline au sein même de la MO est également suggérée par l'expression de gènes codant pour des précurseurs de l'hormone ([Lacroix et al. 2008](#)). Le BO serait par ailleurs la région cérébrale qui contient les taux les plus élevés d'insuline ([Baskin et al. 1983](#)). L'insuline se lie à son récepteur kinase pour induire une multitude de cascades de signalisation. Ce récepteur est très largement présent à tous les niveaux du système olfactif : dans la MO, principalement dans la couche externe qui contient les OSNs matures et leurs boutons dendritiques, et plus faiblement dans les OSNs immatures et les cellules non neuronales ([Lacroix et al. 2008](#)) ; dans le BO, au niveau de la couche plexiforme externe, et des couches des cellules mitrales et granulaires ([Fadool et al. 2000](#)). Dans la MO, la signalisation insulinique se ferait par la voie classique IRS / PI3K

(Lacroix et al. 2008), et via la phosphorylation du canal Kv1.3 dans le BO (Fadool et al. 2000).

Sur des préparations *ex vivo*, un apport d'insuline peut réduire les réponses de la MO aux odeurs et moduler l'activité électro-physiologique des OSNs (Lacroix et al. 2008; Savigner et al. 2009) et des cellules mitrales (Fadool et al. 2011). De plus, suite à une injection ICV, l'insuline altère le comportement olfactif, abolissant le comportement de flairage induit par une odeur de nourriture, et diminuant les capacités de détection des odeurs (Aimé et al. 2012). En revanche, les capacités de discrimination sont augmentées lors d'administrations intranasales d'insuline (Marks et al. 2009).

### *b) La leptine*

La leptine est produite par les adipocytes et les taux de leptine circulante sont corrélés à la quantité de masse grasse de l'organisme. Un rôle clef de la leptine est d'informer le cerveau et les autres organes sur l'état des réserves lipidiques de l'organisme (pour revue, voir Friedman 2014). Chez l'humain, une association a été observée entre les taux de leptine et la capacité d'identification des odeurs (Karlsson et al. 2002) ou l'appréciation de certaines odeurs (Trellakis et al. 2011).

La leptine passe par la circulation principale pour atteindre les différentes structures olfactives, et il existe une production locale de leptine au sein de la MO, où son récepteur est exprimé (Baly et al. 2007). Les différentes isoformes du récepteur à la leptine sont également présentes dans le BO et dans les régions cérébrales liées à l'olfaction (Shioda et al. 1998; Prud'homme et al. 2009; Getchell et al. 2006; Elmquist et al. 1998).

De manière similaire à l'insuline, la leptine est capable de moduler l'activité électro-physiologique des OSNs et de diminuer la réponse de la MO aux odeurs (Savigner et al. 2009).

Les souris *ob/ob* et *db/db*, dont la régulation physiologique par la leptine est supprimée, présentent des capacités olfactives supérieures aux souris sauvages (Getchell et al. 2006). En accord avec ces résultats, Julliard et collaborateurs ont montré que l'injection ICV de leptine chez des rats à jeun provoque une baisse des capacités de détection odorante (Julliard et al. 2007).

### *c) L'adiponectine*

Tout comme la leptine, l'adiponectine est produite par le tissu adipeux. Cependant à l'inverse, les taux d'adiponectine circulante augmentent lorsque les réserves lipidiques diminuent. Ainsi, l'adiponectine constitue un signal de faim, qui favorise la prise alimentaire et limite les dépenses énergétiques (Ahima & Lazar 2008).

Les effets de l'adiponectine sur l'olfaction restent peu explorés. Des transcrits codant pour le récepteur R1 à l'adiponectine ont été identifiés au sein des neurones sensoriels matures de la muqueuse olfactive (Hass et al. 2008). De plus, l'administration intranasale d'adiponectine augmente la réponse odorante des OSNs et l'activité électrique au sein du BO (Loch et al. 2013).

### *d) La cholecystokinine*

La cholecystokinine (CCK) est produite par l'intestin lors d'un repas particulièrement riche en lipides et protéines. Au niveau du tractus digestif, la CCK augmente la motilité et les sécrétions gastriques (Liddle et al. 1985). La CCK traverse également la barrière hémato-encéphalique et agit au niveau de l'hypothalamus pour réduire la prise alimentaire (Woods & D'Alessio 2008).

La CCK atteint aussi les structures cérébrales liées à l'olfaction : BO, noyau olfactif antérieur, cortex piriforme (Beinfeld et al. 1981; Dupont et al. 1982; Ekstrand et al. 2001). Sur des tranches de BO, la CCK augmente la fréquence d'émission des potentiels d'action par les cellules mitrales (Ma et al. 2011). Au sein du BO, la CCK régulerait le traitement glomérulaire du signal olfactif en promouvant l'inhibition intra-glomérulaire des cellules mitrales et à panache, façonnant ainsi le message sortant du BO à destination du cortex piriforme (Liu & Shipley 2010).

Une action de la CCK serait de moduler l'apprentissage et la reconnaissance des odeurs, en particulier dans un contexte d'exploration sociale (Lemaire et al. 1994).

### *e) Le glucose*

Le glucose, principale source d'énergie pour les organismes, constitue également un signal régulateur de la prise alimentaire et de l'homéostasie énergétique. Le fonctionnement de nombreux organes et tissus est sensible aux variations de glucose, et les premiers neurones

gluco-sensibles ont été identifiés dans l'hypothalamus (Burdakov et al. 2005). De la même manière, l'activité des cellules mitrales serait modulée par le glucose (Tucker et al. 2010; Tucker et al. 2013; Al Koborssy et al. 2014).

L'entrée du glucose dans les tissus à partir de la circulation sanguine se fait par des transporteurs membranaires : GLUT qui permet le transport facilité du glucose (McEwen & Reagan 2004), et SGLT qui est un co-transporteur sodium-glucose énergie-dépendant (Yu et al. 2010). En ce qui concerne le système olfactif, l'expression de GLUT1 et GLUT3 a été mise en évidence au sein de la MO (Nunez-Parra et al. 2011). Le glucose peut entrer dans le cerveau en traversant la barrière hémato-encéphalique via un transporteur GLUT1 spécifique (Pardridge et al. 1990), et l'on retrouve des transporteurs dans la plupart des régions cérébrales impliquées dans le traitement de l'information olfactive : BO, cortex piriforme, tubercule olfactif, cortex entorhinal, hypothalamus, hippocampe (Al Koborssy et al. 2014; El Messari et al. 1998).

Chaque facteur pris individuellement a une action propre sur le système olfactif. En conditions physiologiques, l'alternance des périodes de jeûne et de satiété entraîne des variations dans les concentrations de l'ensemble des facteurs, ainsi que dans l'expression de leurs récepteurs, aboutissant à un effet global sur la perception olfactive. Par exemple en cas de jeûne, la diminution de leptine et d'insuline plasmatiques, de glucose et de triglycérides, combinée à l'augmentation d'orexines, serait responsable d'une augmentation coordonnée des réponses des neurones olfactifs dans le bulbe et dans la muqueuse. Ainsi, ce contrôle métabolique concerté aboutit à une réponse adaptative du système olfactif de manière à optimiser les capacités de l'individu à rétablir son état nutritionnel. Plusieurs études chez l'homme et chez le rongeur montrent en effet un lien entre le statut nutritionnel d'un individu et ses capacités olfactives.

## II. Statut nutritionnel et capacités olfactives

Le statut nutritionnel, défini par l'état de faim suite à un jeûne et l'état de satiété après un repas, est connu pour modifier la perception des odeurs. Intuitivement, on imagine que notre capacité à détecter les odeurs, en particulier les odeurs alimentaires, peut être augmentée suite à un jeûne pour favoriser la localisation de la nourriture ; et diminuée après un repas pour arrêter la prise alimentaire.

## 1. Données chez l'homme

Les premières études chez l'homme ont montré que le jeûne prolongé augmentait la sensibilité olfactive, et que celle-ci diminuait après un repas. Les odorants étaient soufflés dans le nez des participants selon une méthode décrite par Elsberg (Elsberg et al. 1936). En utilisant l'odeur de café et une odeur citronnée (portée par la molécule de citral), les auteurs ont mis en évidence une diminution du seuil de détection odorante au cours de la matinée, puis une augmentation de ce seuil de détection après le déjeuner (Goetzi & Stone 1947; Goetzi et al. 1950; Hammer 1951; Schneider & Wolf 1955; Guild 1956).

Des variations diurnes de l'acuité olfactive ont donc été mises en évidence et attribuées à l'alternance des états de jeûne et de satiété.

Cependant, ces effets n'ont pas été retrouvés par des auteurs utilisant également l'odeur de café, ainsi que d'autres odorants (l'iso-amylacétate qui reproduit l'odeur de banane, le n-butanol à odeur décrite comme alcoolisée et piquante, et l'huile essentielle de clou de girofle) (Furchtgott & Friedman 1960; Janowitz & Grossman 1949; Zilstorff-Pedersen 1955).

La principale critique de ces études portait sur le fait que les repas pris par les participants n'étaient pas standardisés. Même si l'apport calorique était estimé, les repas étaient libres et avec ainsi une composition nutritionnelle différente pour chaque participant, ce qui pouvait alors entraîner différents degrés de rassasiement et biaiser la modulation olfactive. De plus, la distribution de l'odeur était discutée, ce qui amena Hummel et collaborateurs à mettre au point un petit dispositif de diffusion des odeurs sous forme de stylo (« *Sniffin' sticks* »), permettant de tester la fonction olfactive en termes de seuil de détection, de discrimination, et d'identification des odeurs (Hummel et al. 1997).

En raffinant ensuite les protocoles et en contrôlant mieux les différents paramètres expérimentaux, Stafford et collaborateurs ont montré que la sensibilité pour le n-butanol était plus grande en état de faim (Stafford & Welbeck 2011), alors qu'Albrecht et collaborateurs n'ont pas mis en évidence d'effet de l'état nutritionnel sur la détection du n-butanol (Albrecht et al. 2009). En revanche, les deux équipes montrent une augmentation de la sensibilité aux odeurs alimentaires (odeur à base d'herbes ou iso-amylacétate) après le repas.

Ainsi, les données obtenues chez l'homme sont assez mitigées. Malgré l'effort de standardisation des repas et l'appréciation du niveau de faim des sujets, les conditions

physiologiques des états de jeune et de satiété pouvaient être différents chez les sujets, qui n'ont pas tous les mêmes besoins nutritionnels ni la même tolérance à l'état de faim. Il serait par ailleurs intéressant d'étudier les performances olfactives des sujets en fonction de leur sexe, puisqu'il existe des différences de sensibilité olfactive entre les hommes et les femmes (Majid et al. 2017).

Mais ces discordances semblent surtout montrer que le rôle de l'olfaction dans le comportement alimentaire est complexe. L'olfaction semble jouer un rôle dans l'initiation de la prise alimentaire mais également dans son arrêt. On remarque aussi un double rôle de l'olfaction à la fois pour la recherche de nourriture et pour l'évitement des aliments avariés. La distinction entre les odeurs de type alimentaires et les odeurs neutres est nécessaire, puisqu'elles n'ont pas la même signification en termes de valeur hédonique, palatabilité et récompense, et vont donc engendrer des réactions comportementales différentes.

La différence de sensibilité odorante suivant l'état nutritionnel ne semble ainsi pas généralisable. D'un point de vue théorique, la sensibilité à jeun pour une odeur neutre peut être soit diminuée car l'odeur n'est pas pertinente au vu des besoins nutritionnels ; ou au contraire augmentée pour faciliter la détection des odeurs de prédateurs pendant la recherche de nourriture. La sensibilité pour les odeurs alimentaires peut être augmentée à jeun pour favoriser la recherche de nourriture, mais peut aussi être augmentée après un repas dans le but de sélectionner plus efficacement les aliments et de stopper l'ingestion de ceux qui ne sont plus intéressants pour restaurer les besoins nutritionnels.

## 2. Données chez le rongeur

Chez l'animal, il est plus facile de standardiser les paramètres alimentaires (composition, durée et fréquence des repas, quantité de nourriture contrôlée).

Par la technique d'aversion olfactive conditionnée, Aimé et collaborateurs ont mis en évidence chez le rat une meilleure sensibilité olfactive pour l'iso-amylacétate en condition de jeune qu'en état de satiété (Aimé et al. 2007). De plus, des rats mis à jeun passent plus de temps à explorer une odeur alimentaire que des rats rassasiés, ceci étant associé à une augmentation de l'activation neuronale dans la couche des cellules mitrales du BO (Prud'homme et al. 2009).

Ces résultats concordent également avec les études électrophysiologiques montrant une augmentation de l'activité électrique des cellules mitrales dans le bulbe olfactif en réponse à une présentation odorante chez le rat à jeun (Apelbaum & Chaput 2003; Pager et al. 1972).

En situation physiologique, les capacités olfactives sont donc modulées par le statut nutritionnel. Lors d'un jeûne ou après un repas, les différents facteurs métaboliques produits afin d'assurer l'homéostasie énergétique agissent également sur le système olfactif pour induire une réponse comportementale cohérente.

Que se passe-t-il alors en situation pathologique, lorsque les taux des facteurs métaboliques sont anormaux ?

### III. Pathologies métaboliques et olfaction

Les désordres métaboliques tels que l'obésité et le diabète sont caractérisés par des perturbations persistantes dans les teneurs plasmatiques des facteurs régulant l'appétit et l'homéostasie énergétique, dont on a montré l'action sur le système olfactif. Ainsi, ces désordres sont souvent associés à des altérations de la physiologie olfactive.

#### 1. Obésité

Selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), l'obésité se définit comme une accumulation excessive ou anormale de graisse corporelle, qui présente un risque pour la santé. Les anomalies métaboliques et endocrines le plus souvent associées à l'obésité sont l'hyperglycémie, l'hyperinsulinémie, l'hyperleptinémie, ainsi que la baisse des taux basaux de ghréline et de CCK (Neary & Batterham 2009).

Une première étude de Guild et collaborateurs a suggéré une baisse d'acuité olfactive chez des sujets obèses par rapport à des sujets non-obèses (Guild 1956). Bien que cette étude soit discutable du point de vue méthodologique (groupes de 5 patients seulement, méthode de stimulation odorante), la présence de troubles olfactifs chez des personnes atteintes d'obésité morbide a été relevée dans une étude de plus grande échelle qui utilisait des questionnaires d'auto-évaluation (Richardson et al. 2004). Puis une diminution des seuils de détection de l'odeur du café et d'anis a été montrée chez des enfants souffrant d'obésité simple (Obrebowski et al. 2000). Plus récemment, il a été mis en évidence au sein de différentes cohortes une corrélation négative entre performance olfactive et IMC, taux de leptine et masse grasse (Fernandez-Garcia et al. 2017; Pastor et al. 2016; Skrandies & Zschieschang 2015). Dans ces dernières études, la performance olfactive était évaluée par un score regroupant les résultats obtenus pour trois tests olfactifs : un test pour déterminer

le seuil de détection du n-butanol, un test de discrimination et un test d'identification d'odeurs.

En revanche, Stafford et collaborateurs ont montré une meilleure sensibilité olfactive chez des patients obèses pour une odeur de chocolat (Stafford & Whittle 2015), et une corrélation positive entre l'indice de masse corporelle et la capacité de détection d'une odeur alimentaire à base d'herbes (Stafford & Welbeck 2011). Ces résultats, apparemment contradictoires avec les données précédentes, s'expliquent en fait par la différence de nature et de signification des odeurs utilisées.

Les individus obèses présenteraient une meilleure sensibilité olfactive pour les odeurs d'aliments palatables, et une baisse de sensibilité pour les autres odeurs.

Chez l'animal, des modèles d'obésité génétique existent et leurs capacités olfactives ont été étudiées. Le rat Zucker possède une mutation dans le gène codant pour le récepteur à la leptine, ce qui lui confère un phénotype obèse associé à une hyperphagie, une baisse de dépense énergétique, une hyperleptinémie et une hyperinsulinémie (Bray 1977). Comparés à des rats non obèses, les rats Zucker présentent une sensibilité olfactive augmentée pour l'odeur alimentaire de bacon (Thanos et al. 2013) et une meilleure capacité de détection de l'iso-amylacétate (Aimé et al. 2014). Chez la souris, ce phénotype obèse peut être obtenu par mutation dans le gène codant pour la leptine (souris ob/ob) ou pour son récepteur (souris db/db). Les souris ob/ob et db/db sont plus performantes que des souris sauvages lors d'un test de recherche de nourriture qui implique de retrouver un biscuit salé au fromage caché dans de la litière (Getchell et al. 2006), suggérant ainsi des capacités olfactives augmentées chez ces souris. A l'inverse, les souris *knock-out* (KO) pour le récepteur à mélanocortine (MC4R), un autre modèle murin d'obésité génétique (Huszar et al. 1997), mettent plus de temps que les souris sauvages pour retrouver le même type de biscuit salé dans des conditions expérimentales similaires (Tucker et al. 2012a). Ces souris KO pour MC4R sont également incapables de discriminer deux odorants dits neutres (l'acétate de géranyle à odeur florale et fruitée et l'extrait de menthe poivrée), alors qu'elles sont capables de distinguer les odeurs de deux acides gras (acide oléique et acide linoléique) (Tucker et al. 2012a).

Dans ces modèles d'animaux génétiquement obèses, l'absence totale de signalisation de la leptine serait responsable de l'amélioration des capacités olfactives, quelle que soit l'odeur étudiée. En ce qui concerne les souris KO pour MC4R, seule une sous branche de la signalisation de la leptine est touchée. Chez ces animaux, les taux élevés de leptine circulante pourraient expliquer les capacités olfactives diminuées (Tucker et al. 2012a).

L'obésité est une pathologie multifactorielle impliquant des causes génétiques et environnementales. Mais l'alimentation et le mode de vie sédentaire restent des facteurs de risque principaux de développer une obésité. Plusieurs travaux se sont intéressés aux effets de l'obésité induite par l'alimentation sur la perception olfactive. Des souris soumises à une alimentation enrichie en graisses présentent une sensibilité olfactive diminuée 6 mois (Tucker et al. 2012a; Thiebaud et al. 2014) et 3 mois (Takase et al. 2016) après le changement d'alimentation.

Des données non encore publiées de notre équipe montrent également qu'à plus court terme, des souris adolescentes exposées pendant 2 mois à une alimentation HFHS mettent plus de temps pour retrouver un morceau de fromage dans un test de nourriture enfouie que des souris du même âge sous alimentation classique (Jarriault D. communication personnelle). Ces perturbations olfactives seraient en partie dues à une baisse de sensibilité de la muqueuse olfactive, liée à des cils olfactifs plus courts.

## 2. Diabète

Le diabète est un désordre métabolique qui touche le métabolisme du glucose et la signalisation de l'insuline. Il existe deux types de diabète : le diabète de type 1 ou diabète insulino-dépendant, caractérisé par une hyperglycémie et un déficit en insuline ; et le diabète de type 2 ou diabète non insulino-dépendant, caractérisé par une résistance à l'insuline.

Plusieurs équipes ont montré que des patients diabétiques présentaient des troubles olfactifs dans un test qui consistait à identifier des odeurs (Le Floch et al. 1993; Weinstock et al. 1993; Naka et al. 2010). Ces troubles peuvent provenir soit d'une incapacité à détecter les odeurs présentées, soit de difficultés cognitives ou mnésiques pour retrouver le nom de l'odeur sentie parmi la liste proposée. Une analyse plus fine des capacités de détection, de discrimination et d'identification des odeurs a permis de préciser les dysfonctions olfactives associées au diabète (Gouverni et al. 2014). Il faut toutefois noter que le diabète s'accompagne souvent d'obésité ou de surpoids, et qu'il engendre également d'autres complications médicales (en particulier une atteinte des micro-vaisseaux), et il est difficile de discerner les effets propres au diabète sur l'olfaction.

Les modèles animaux d'obésité induite par l'alimentation (DIO) développent aussi généralement un diabète. Pour étudier les effets spécifiques du diabète, il existe un modèle de rats dérivés du rat Wistar qui deviennent spontanément hyperglycémiques à l'âge adulte

(Portha et al. 2012). Ces rats présentent des déficits de détection des odeurs et de mémoire olfactive, associés à une diminution de la neurogenèse au sein du bulbe olfactif et à une baisse de différenciation des neurones dans le cortex piriforme (Lietzau et al. 2018).

Il est également possible d'induire un diabète de type 1 chez le rat ou la souris sauvage de manière pharmacologique. L'injection de streptozotocine va détruire spécifiquement les cellules  $\beta$  des îlots de Langerhans, supprimant ainsi toute production d'insuline.

Des rats rendus diabétiques par injection de streptozotocine présentaient une baisse de sensibilité olfactive pour une odeur neutre (l'amyli acetate) et pour une odeur alimentaire dans un test de nourriture enfouie (Jing et al. 2017). Dans le même temps, la prolifération des cellules souches et l'expression des éléments de signalisation de l'insuline étaient fortement diminuées dans la (SVZ) (Jing et al. 2017). Cette étude montre que l'action de l'insuline sur le système olfactif n'est pas seulement de moduler le fonctionnement des neurones. L'insuline favorise également la prolifération cellulaire et participe ainsi à la plasticité structurelle du BO.

Enfin, des souris soumises à une alimentation riche en fructose développent rapidement un phénotype diabétique associé à des perturbations olfactives. Dans l'étude de Rivière et collaborateurs, les souris présentaient une altération des capacités de détection et de discrimination des odeurs après seulement 4 semaines d'alimentation riche en fructose (Rivière et al. 2016). Les auteurs ont également rapporté une perturbation de la dynamique cellulaire au sein de la muqueuse olfactive ainsi qu'une plus faible sensibilité des OSNs.

A travers cette partie, nous avons passé en revue les principaux éléments de modulation du système olfactif par les acteurs du métabolisme et de l'homéostasie énergétique. Cette influence métabolique sur l'olfaction permet d'optimiser la perception odorante en fonction de l'état interne de l'organisme, afin d'induire des comportements appropriés. En cas de dérégulation chronique du système de régulation de l'homéostasie énergétique, les capacités olfactives sont également perturbées. Compte tenu de l'importance de l'olfaction pour de nombreux comportements (soulignée dans la partie 2 – I.), les dysfonctions olfactives associées aux pathologies métaboliques peuvent être préjudiciables pour un individu.

La dysfonction olfactive en tant que cause ou conséquence des désordres métaboliques est une question en suspens. Nous avons mentionné que dans plusieurs cohortes, les personnes obèses présentaient une baisse d'acuité olfactive. En revanche, dans une population d'anosmiques congénitaux, la fréquence des personnes en surpoids n'était pas supérieure à

la prévalence du surpoids au sein la population générale ([Aschenbrenner et al. 2008](#)). On pourrait donc penser que la dysfonction olfactive ne peut être une cause en soi de l'obésité.

Les modèles animaux ne permettent pas de trancher quant à l'implication de l'olfaction dans le développement de l'obésité. Deux modèles semblent s'opposer : chez la souris, la délétion du canal ionique Kv1.3 induit une forte augmentation de l'acuité olfactive (phénotype qualifié de « super-smeller ») et une résistance à l'obésité induite par l'alimentation ([Fadool et al. 2004](#); [Tucker et al. 2012b](#)) ; tandis que l'ablation des OSNs induit une baisse de l'acuité olfactive et prévient également l'obésité induite par l'alimentation ([Riera et al. 2017](#)).

## Partie 4 : Problématique et objectifs

---

Les habitudes alimentaires actuelles sont caractérisées par un apport calorique conséquent associé à une consommation croissante de sucres libres et de graisses. Malgré les recommandations de l'OMS, qui préconise un apport en sucres libres de moins de 10 % de la ration énergétique totale chez l'adulte et l'enfant (WHO 2015), et un apport en graisses qui ne devrait pas dépasser 30 % de la ration énergétique totale (OMS 2018a), les adultes Français consomment 19 % de sucres et 34 % de lipides (dont la moitié constituent des acides gras saturés) chaque jour (ANSES 2017). Une telle alimentation, hautement énergétique, combinée à un mode de vie sédentaire, contribue au développement du surpoids, de l'obésité, et des maladies métaboliques sous-jacentes. Selon les estimations de l'OMS, 39 % de la population mondiale était en surpoids et 13 % souffrait d'obésité en 2016 (OMS 2018b). L'obésité touche en France plus de 15 % des adultes et globalement, un Français sur deux est en surpoids ou obèse ; et près d'un Américain sur cinq présente un IMC supérieur à 30 kg/m<sup>2</sup>, ce qui définit l'obésité (OCDE 2017).

Les femmes en âge de procréer n'échappent pas à ces statistiques. Aux Etats-Unis dans l'état de l'Alabama, la prévalence du surpoids et de l'obésité parmi les femmes enceintes à atteint plus de 20 % entre 1980 et 1999 (Lu et al. 2001). En 2016 en France, 20 % des mères étaient en surpoids et près de 12 % étaient obèses (INSERM & DREES 2017).

Le surpoids et l'obésité maternels entraînent un risque plus élevé de pré-éclampsie et de mortalité maternelle et fœtale, et impactent à plus long terme le poids et la santé générale de l'enfant (INSERM & DREES 2017).

Pendant la grossesse, le placenta est en effet sensible à l'alimentation maternelle et au statut métabolique de la mère, ce qui influence le développement des organes fœtaux (Barnes & Ozanne 2011). Ainsi, chaque tissu en développement s'adapte à l'environnement nutritionnel intra-utérin. De nombreux travaux ont été menés chez le rongeur pour mettre en évidence les différentes altérations fœtales causées par l'obésité maternelle ou par une alimentation riche en graisses et en sucres sans développement de pathologies métaboliques chez la mère, ainsi que leurs conséquences à long terme chez la progéniture adulte (Williams et al. 2014). De plus, les apports nutritionnels des nouveau-nés sont fournis par le lait maternel, dont la composition dépend des aliments ingérés par la mère. Ainsi, le développement postnatal est également conditionné par l'alimentation maternelle.

Le système olfactif se développe chez le rongeur à partir du 9<sup>ème</sup> jour embryonnaire (De Castro 2009) et atteint sa maturité complète à 3 semaines de vie (Zou et al. 2004). Son développement est donc susceptible d'être impacté si le statut métabolique de la mère n'est pas optimal au moment de la gestation et si son alimentation est trop riche en graisses et en sucres tout au long de la gestation et de la lactation.

Si le développement du système olfactif est perturbé, la perception des odeurs sera potentiellement modifiée chez le jeune individu. Un tel effet compromettrait l'établissement des comportements vitaux médiés par les odeurs, comme l'évitement des dangers, l'interaction avec les congénères, ou encore la régulation du comportement alimentaire.

Ainsi, la problématique de cette thèse était de savoir si une alimentation maternelle HFHS pendant les périodes de préconception, de gestation et de lactation pouvait impacter la physiologie olfactive de la progéniture.

Pour ce faire, l'étude expérimentale a été menée chez la souris, et le premier objectif était de mettre en place un protocole d'exposition maternelle à un aliment HFHS et de caractériser l'impact métabolique du protocole sur les mères et sur la progéniture.

Le deuxième objectif a été d'explorer le comportement olfactif de la progéniture à l'âge de 3 semaines, c'est-à-dire au moment du sevrage, afin de déterminer si les capacités olfactives des petits nés d'une mère exposée à l'aliment HFHS étaient impactées ou non.

Le troisième objectif consistait à étudier le fonctionnement du système olfactif périphérique des petits de 3 semaines, par une technique de biologie moléculaire et par une approche électrophysiologique.

Le quatrième objectif avait pour but d'investiguer certains aspects du traitement central du signal olfactif, en se focalisant sur la morphologie neuronale dans le BO et l'activation neuronale au sein du cortex piriforme.

Enfin, le dernier objectif de la thèse visait à comparer nos résultats expérimentaux avec un modèle d'alimentation maternelle normo-lipidique, mais enrichie ou déficiente en AG polyinsaturés (AGPI) n-3.

# Résultats Expérimentaux

# Protocole expérimental général

---

Cette première partie expérimentale vise à exposer les caractéristiques générales de mise sous régime afin de générer des souriceaux soumis ou non à une exposition périnatale au gras et au sucre à travers l'alimentation maternelle.

## I. Caractéristiques des régimes utilisés

Trois régimes alimentaires ont été utilisés dans cette étude et provenaient du fournisseur Safe. Le régime entretien est un aliment complet destiné à des animaux adultes et qui peut être donné dès le sevrage. Le régime standard (SD, *standard diet*) est un aliment d'élevage, destiné en particulier aux animaux gestants ou allaitants car plus enrichi en protéines que le régime entretien. Le régime HFHS constitue l'aliment gras et sucré, conçu spécifiquement par Safe pour obtenir des gains de poids totaux ou de masse adipeuse. La composition des régimes est résumée dans le [Tableau 1](#).

Composition	Régime entretien	SD	HFHS
<b>Protéines</b>	18,3 % (poisson et protéines végétales)	24,3 % (poisson et protéines végétales)	20 % (caséine)
<b>Glucides</b>	68,6 %	59,2 %	42,3 %
<b>Lipides</b>	3,5 %	5,8 %	22,5 %
<b>Fibres</b>	4,4 %	4,6 %	7,2 %
<b>Minéraux</b>	3,8 %	4,7 %	7 %
<b>Vitamines</b>	1,4 %	1,4 %	1 %

Tableau 1 : [Composition des régimes utilisés](#)

La composition en nutriments énergétiques des trois régimes est différente, ce qui entraîne un apport énergétique global différent. La valeur énergétique des régimes entretien et SD est de 3,3 et 3,4 Kcal/g respectivement, alors que le régime HFHS apporte 4,4 Kcal/g d'aliment.

Le régime HFHS est donc hypercalorique par rapport aux deux autres régimes. La part d'énergie apportée par les glucides et les lipides dans chaque régime est représentée sur la Figure 16.

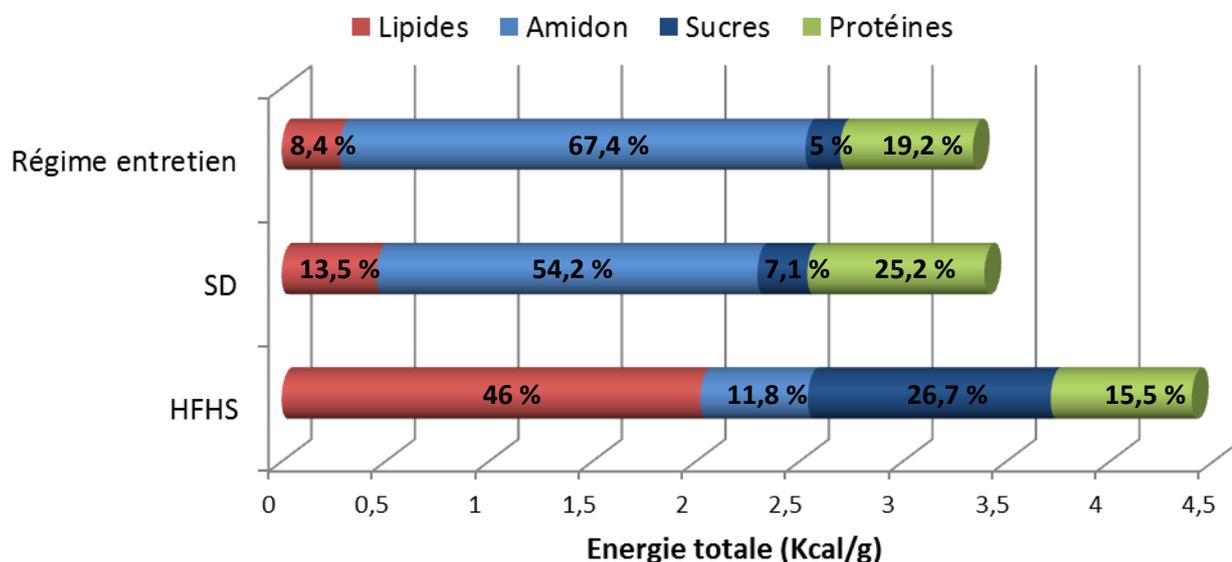


Figure 16 : Composition énergétique des régimes

Les lipides représentent près de la moitié de l'énergie totale apportée par le régime HFHS et proviennent majoritairement de graisse de porc, riche en acides gras saturés (AGS) (Saindoux 88,9 %, contre 11,1 % à partir d'huile de soja). Les lipides des régimes entretien et SD proviennent quant à eux exclusivement des céréales utilisées pour fabriquer l'aliment. La composition détaillée en AG provenant d'une analyse réalisée au CSGA sera présentée dans le chapitre suivant (Tableau 3).

L'apport glucidique des régimes entretien et SD est essentiellement fourni par de l'amidon, c'est-à-dire un sucre complexe, alors qu'un sucre simple, le saccharose, compose 69 % des glucides du régime HFHS.

## II. Animaux et exposition au régime HFHS

Cette étude expérimentale est menée chez le rongeur, plus particulièrement chez la souris, dont le système olfactif est relativement bien connu. Toutes les souris utilisées provenaient de la souche SR1-IRES-tauGFP. Ces souris expriment la protéine de fluorescence verte (GFP) sous le contrôle du promoteur du RO SR1 (MOR256-3 ou Olfr124) (Grosmaître et al. 2009). Il est donc possible de visualiser spécifiquement les populations d'OSNs qui expriment SR1,

celles-ci se situant principalement au sein de l'OS et dans la partie ventro-postérieure de la MO. Ces souris transgéniques possèdent un fond génétique très similaire à celui d'une souris de laboratoire classique : la souche C57Bl/6J.

Les souris naissent et sont hébergées dans une salle en cycle inversé, la lumière s'allumant à 17h et s'éteignant à 5h. Ainsi, toutes les manipulations sont effectuées lors de la période d'activité des souris (période sombre). Les conditions de température et d'humidité sont maintenues constantes (environ 22 °C et 50 % d'humidité). Les animaux sont hébergés dans des cages conventionnelles à hauteur de 2 ou 3 individus par cage, avec un accès *ad libitum* à l'eau et au régime entretien.

L'exposition au régime HFHS a été réalisée de deux manières.

### 1. Design expérimental 1

A l'âge de 6-8 semaines, les femelles sont mises en cages individuelles, toujours avec le régime entretien *ad libitum*. Pour chaque femelle, un mâle d'âge similaire est introduit dans la cage pendant 5 jours. Après cette période de mise en couple, le mâle est retiré et l'aliment de la femelle est changé. La femelle reçoit alors soit le régime SD, soit le régime HFHS, et est maintenue sous le même régime pendant sa période de gestation et de lactation. Le poids des femelles est suivi deux fois par semaine pendant la gestation, et si une femelle ne devient pas gestante, elle est écartée du protocole. Le jour de mise bas est noté comme étant le jour de gestation 21 (G21), égal à PND 0. A PND 1, la taille des portées est standardisée à  $6 \pm 1$  petits. Cette homogénéisation des portées permet d'assurer une attention maternelle et un accès au lait similaires pour tous les petits, évitant ainsi le biais lié au nombre de petits. Le poids de la mère et des petits est également suivi pendant la lactation. Les caractéristiques d'allaitement des mères (volume et composition du lait maternel) sont évaluées à PND 10 (qui correspond aussi au 10<sup>ème</sup> jour de lactation L10). La physiologie métabolique et olfactive de la progéniture est ensuite étudiée chez les mâles au moment du sevrage (entre PND 17 et PND 22). Les petits restent donc avec leur mère jusqu'à la fin du protocole et ne reçoivent pas d'alimentation solide directe autre que l'aliment présent dans la mangeoire de la cage de leur mère.

Seule la progéniture mâle est étudiée car mâles et femelles ne sont pas sensibles de la même manière à l'exposition périnatale au gras et au sucre (Williams et al. 2014). De plus, bien que la progéniture ne soit pas encore sexuellement mature au moment des

expérimentations, les hormones androgéniques ou oestrogéniques peuvent influencer les capacités olfactives et ainsi biaiser les résultats.

La physiologie olfactive est étudiée au moment du sevrage chez le jeune individu car le système olfactif est alors mature, et l'olfaction va avoir une importance considérable pour guider le petit dans ses comportements vitaux (se nourrir, interagir avec ses congénères, éviter d'éventuels dangers).

## 2. Design expérimental 2

Dans un second temps, nous avons voulu savoir si une exposition maternelle au gras et au sucre débutant 2 mois avant la gestation induirait un effet exacerbé par rapport à l'exposition restreinte aux périodes de gestation et lactation. Pour ce faire, les femelles de 6-8 semaines ont reçu soit le régime SD, soit le régime HFHS pendant 8 semaines avant d'être mises en couple. La suite du protocole était la même que pour le design 1, les femelles recevant toujours le même régime tout au long de la procédure.

Ainsi, 4 groupes de femelles ont été constitués pour produire différentes progénitures (Figure 17).

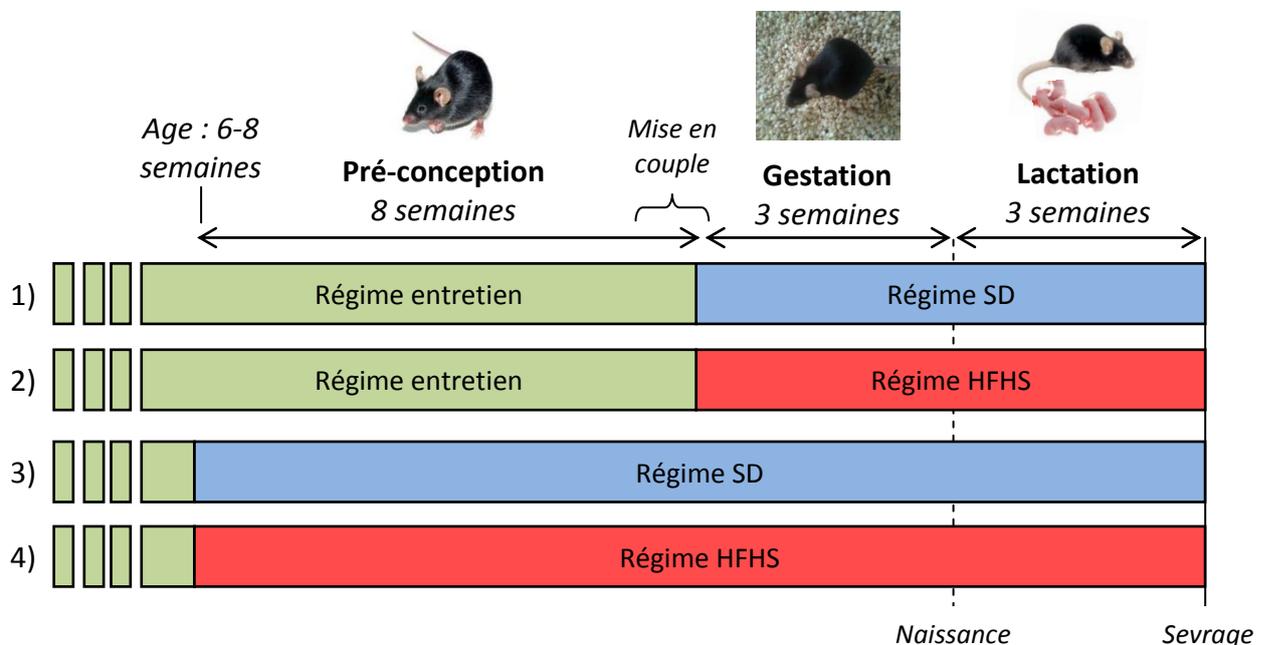


Figure 17 : Protocoles expérimentaux de mise sous régime

Pour faciliter l'interprétation des données, les progénitures ont été réparties suivant le temps d'exposition maternelle à l'alimentation HFHS.

- Les souris provenant de mères n'ayant jamais reçu l'alimentation HFHS (groupes 1) et 3) sur la figure 13) constituent le groupe contrôle (CTRL).
- Les petits issus de mères ayant consommé le régime HFHS pendant la période de gestation et de lactation seulement sont appelés « groupe HFHS gest-lact ».
- La progéniture des mères exposées à l'aliment HFHS pendant 8 semaines puis pendant la gestation et la lactation font partie du groupe HFHS 8w + gest-lact.

Les souris du groupe CTRL n'ont pas toujours été générées et étudiées au même moment. De plus, l'alimentation des mères des souris CTRL est similaire sur la durée du protocole mais pas tout à fait identique pendant la période de pré-conception (aliment entretien pour les mères du groupe 1) et SD pour les mères du groupe 3) sur la figure 13). Avant de grouper les progénitures des mères des groupes 1) et 3) en un même groupe CTRL, l'homogénéité des données a été systématiquement vérifiée par comparaison statistique entre les deux groupes.

# Objectif 1 : Caractérisation métabolique du modèle

---

Comme nous l'avons expliqué dans la partie 1 des données bibliographiques, il existe de nombreux modèles d'obésité maternelle et d'exposition périnatale au gras et sucre. Ces modèles varient en termes d'animal étudié (rat, souris) et de souche, d'aliment utilisé (composition, texture), et de durée d'exposition à l'aliment. Bien qu'il soit généralement admis qu'une alimentation maternelle grasse et sucrée peut impacter la physiologie métabolique, ces variations de protocoles entraînent des différences d'impact métabolique sur les mères exposées et sur la progéniture. Il nous a donc semblé nécessaire avant toute chose de caractériser l'état physiologique et métabolique induit par notre propre design expérimental. L'impact métabolique de l'alimentation HFHS a donc été évalué sur les mères avant gestation (période de préconception) ainsi que pendant la gestation et la lactation (période de développement *in utero* et postnatal), et sur les petits depuis leur naissance jusqu'à l'âge de 3 semaines.

## I. Impact métabolique de l'alimentation HFHS sur les mères

### 1. Effet du régime HFHS pendant les deux mois de préconception

Pour cette partie, seules les femelles des groupes 3) et 4) de la figure 13 ont été comparées. Le poids et la prise alimentaire des femelles ont été suivis pendant les 2 mois précédant la mise en couple (Figure 18).

Suite à deux mois d'alimentation HFHS, les souris femelles ne sont pas devenues obèses ni même en surpoids. Au contraire, leur gain de poids était inférieur à celui des souris sous alimentation standard : la prise de poids totale était de 1,7 g pour les souris sous HFHS contre 2,9 g pour les souris sous SD (Figure 18.C, (t ; df) = (3,449 ; 35), p = 0,0015).

Pourtant, les femelles soumises à l'alimentation HFHS ont ingéré plus de calories que les souris sous alimentation standard pendant les deux mois (Figure 18.B, F(1,24) = 6,783, p = 0,0156).

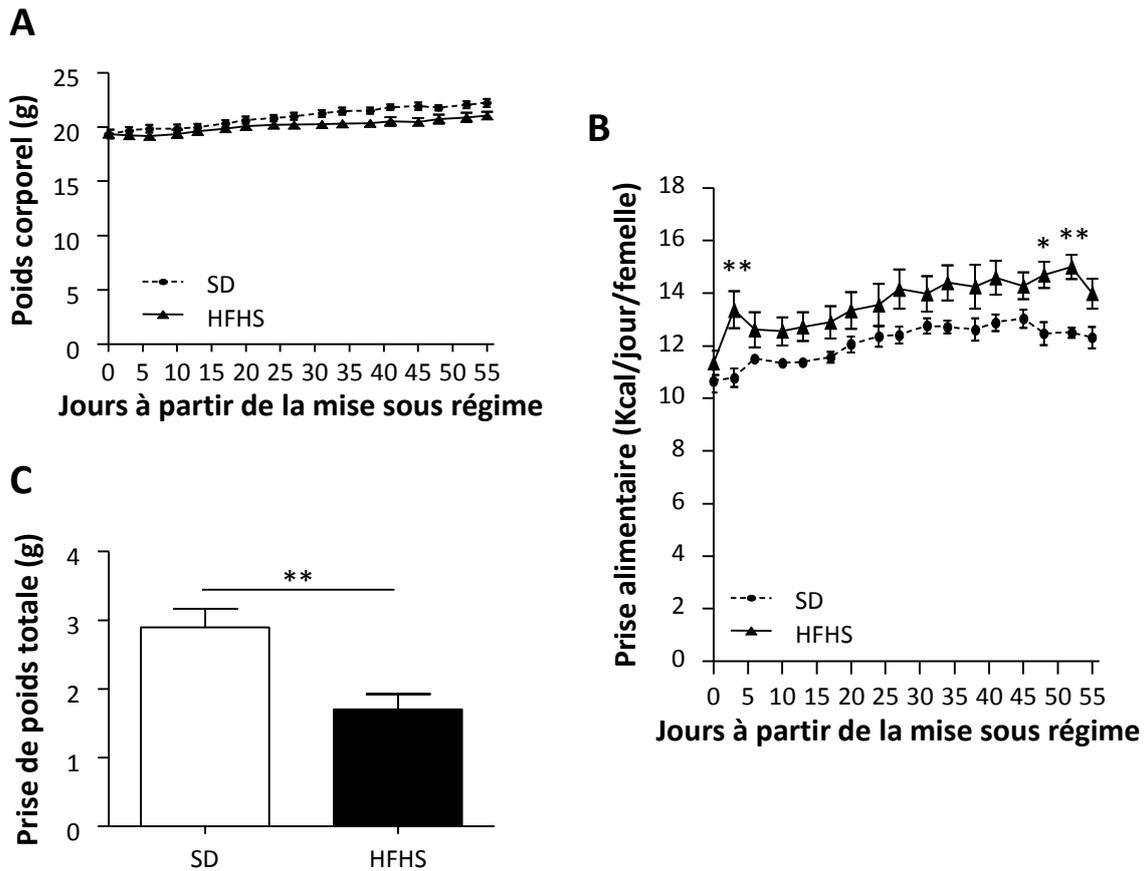


Figure 18 : Suivi du poids et de la prise alimentaire des femelles pendant les deux mois de préconception

A. Evolution du poids. B. Evolution de la prise alimentaire. C. Prise de poids totale deux mois après la mise sous régime. A et C : SD : n=18, HFHS : n=19 ; B : SD : n=13, HFHS : n=13. Toutes les données sont représentées en moyennes  $\pm$  sem. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$  après une ANOVA à deux facteurs sur mesures répétées suivie de comparaisons multiples de Bonferroni (A et B), ou un test t de Student sur données non appariées (C).

Il a déjà été relevé qu'un tel environnement obésogène n'induit pas forcément d'obésité chez la souris femelle (Wahlig et al. 2012). Il semblerait que notre souche de souris soit plutôt résistante à l'obésité induite par l'alimentation. Cependant, l'ingestion chronique d'un aliment hypercalorique et enrichi en lipides et en sucre simple peut perturber le métabolisme sans modifier le poids corporel. Nous avons donc réalisé un test de tolérance au glucose par injection intra-péritonéale (ipGTT) (Bowe et al. 2014) chez les souris femelles nourries avec les deux types d'alimentation.

Suite à une mise à jeun de 5h, la glycémie basale des souris était similaire quel que soit le régime administré (Figure 19.A, (t ; df) = (0,729 ; 21), p = 0,474). En injectant les souris avec 2g/kg de glucose en i.p., la glycémie des souris sous HFHS a augmenté plus fortement que celle des souris sous SD et les valeurs d'aire sous la courbe montrent une intolérance au glucose développée par les souris sous HFHS (Figure 19.B histogramme, (t ; df) = (3,764 ; 21), p = 0,0011).

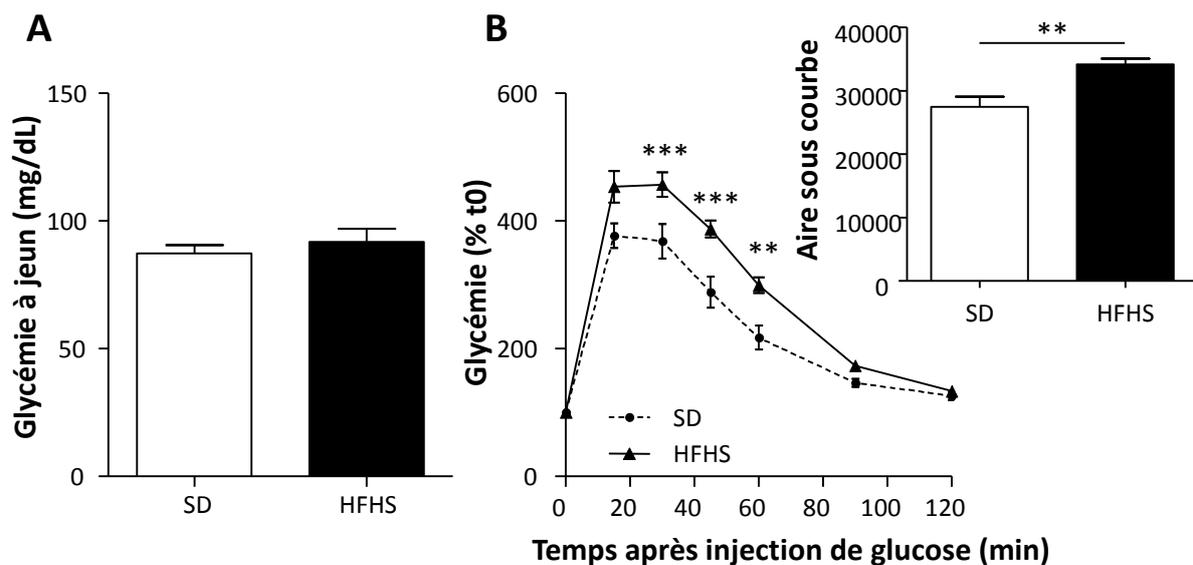


Figure 19 : Evaluation de la tolérance au glucose après 2 mois de régime SD ou HFHS

A. Glycémie mesurée après une mise à jeun de 5h. B. Evolution de la glycémie pendant 2h après injection i.p. d'un bolus de glucose (2g/kg) suite à une mise à jeun de 5h, avec représentation de l'aire sous la courbe. SD : n=11, HFHS : n=12. Toutes les données sont représentées en moyennes  $\pm$  sem. \*\* p < 0,01, \*\*\* p < 0,001 après une ANOVA à deux facteurs sur mesures répétées suivie de comparaisons multiples de Bonferroni (B graphe), ou un test t de Student sur données non appariées (A et B histogramme).

Avant d'être mises en couples, les femelles sous alimentation HFHS sont donc intolérantes au glucose, mais ne sont pas en surpoids par rapport aux femelles sous alimentation SD, malgré l'ingestion plus élevée de calories. Ainsi dans notre protocole, nous observons les effets de l'alimentation maternelle HFHS indépendamment de l'obésité maternelle.

Après deux mois d'exposition à l'aliment HFHS, le métabolisme glucidique des femelles est perturbé. D'autre part, une exposition au régime HFHS chez de jeunes mâles de la même souche conduit à une accumulation de graisse viscérale sans surpoids (Jarriault D.,

communication personnelle). On peut donc supposer que la composition corporelle des femelles serait elle aussi modifiée.

## 2. Poids et prise alimentaire pendant la gestation et la lactation

Le poids et la prise alimentaire des femelles ont également été suivis tout au long de la gestation et de la lactation (Figure 20).

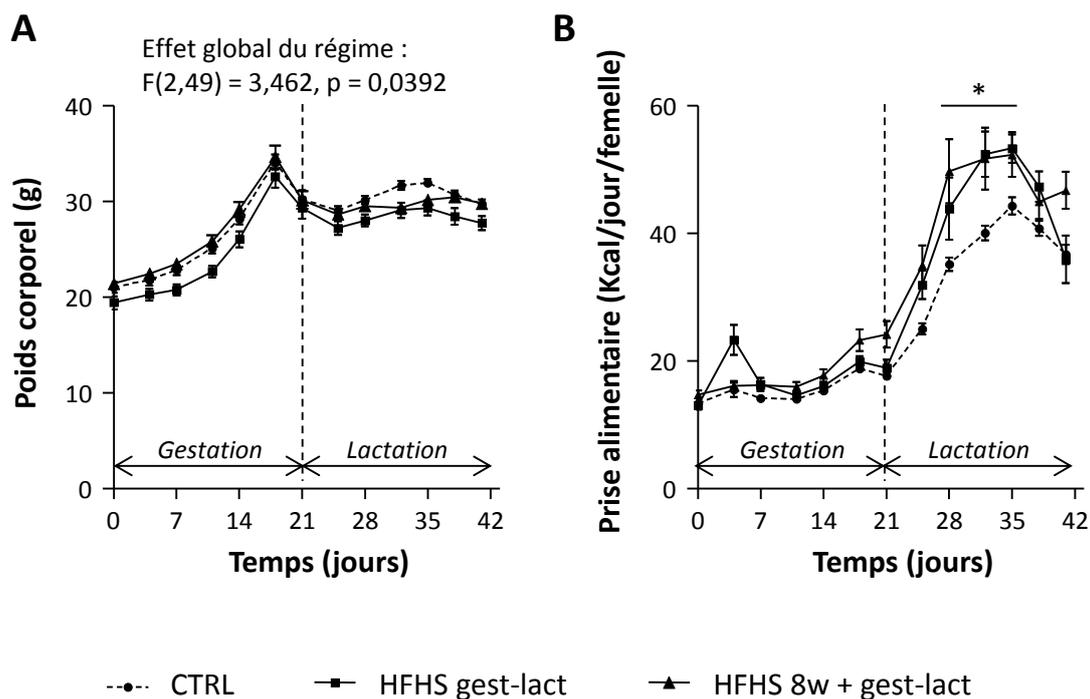


Figure 20 : Poids et prise alimentaire des mères pendant la gestation et la lactation

A. Evolution du poids (CTRL: n=25, HFHS gest-lact: n=13, HFHS 8w + gest-lact: n=14). B. Evolution de la prise alimentaire (CTRL: n=22, HFHS gest-lact: n=11, HFHS 8w + gest-lact: n=13). Toutes les données sont représentées en moyennes  $\pm$  sem. \*  $p < 0,05$  après une ANOVA à deux facteurs sur mesures répétées suivie de comparaisons multiples de Bonferroni.

Pendant la gestation et la lactation, l'évolution du poids corporel des femelles était légèrement différente au sein des trois groupes (Figure 20.A,  $F(2,49) = 3,462, p = 0,0392$ ). On observe en particulier que les femelles du groupe CTRL reprennent plus de poids que les femelles des deux groupes HFHS après leur mise bas, alors qu'elles ingèrent moins de calories (Figure 20.A,  $F(2,43) = 8,548, p = 0,0007$ ).

La lactation constitue un véritable challenge métabolique pour les femelles, en raison du trafic des nutriments provenant de l'alimentation vers les glandes mammaires et de la synthèse *de novo* de lipides accrue. L'exposition à un régime modérément enrichi en lipides sans induire d'obésité augmenterait le trafic des lipides alimentaires vers le tissu adipeux, le foie et les glandes mammaires tout en diminuant la lipogenèse *de novo* dans ces tissus (Wahlig et al. 2012; Saben et al. 2014b).

Le poids plus faible des femelles sous régime HFHS malgré l'excès d'énergie ingérée pourrait refléter une charge métabolique de l'allaitement plus importante chez ces femelles à cause de l'alimentation HFHS. Cette charge métabolique pourrait être due à :

- un trafic des nutriments alimentaires plus important
- un coût plus élevé pour la synthèse des protéines et/ou de lactose à destination du lait maternel
- une augmentation de la dépense énergétique lors des comportements maternels associés à l'allaitement (déplacement et regroupement des petits, toilettage).

### 3. Impact de l'alimentation HFHS sur la taille des portées et la mortalité à la naissance

Plusieurs études suggèrent que l'alimentation maternelle HFHS augmenterait le taux de mortalité des petits à la naissance à cause d'un manque d'attention maternelle (voir un comportement de cannibalisme) et/ou des difficultés d'allaitement (Bellisario et al. 2015; Buonfiglio et al. 2016).

Nous avons voulu vérifier si dans notre protocole l'alimentation maternelle HFHS avait un effet sur la mortalité néonatale et sur la taille des portées.

Les femelles des trois groupes ont en moyenne mis bas des portées d'environ 6 petits ( $5,7 \pm 1,8$  pour le groupe CTRL,  $5,7 \pm 2,3$  pour le groupe HFHS gest-lact et  $6,1 \pm 2,1$  pour le groupe HFHS 8w + gest-lact). L'alimentation maternelle HFHS n'a donc pas modifié les tailles des portées à la mise bas (Figure 21.A,  $F(2,100) = 0,382$ ,  $p = 0,684$ ) et notre ajustement des portées à  $6 \pm 1$  petits est cohérent avec la taille moyenne « naturelle » des portées.

La mortalité néonatale était également similaire au sein des portées des trois groupes de femelles (Figure 21.B,  $K = 4,953$ ,  $p = 0,0841$ ). L'alimentation maternelle HFHS ne semble donc pas avoir induit de comportement maternel de cannibalisme exacerbé. Il est par ailleurs intéressant de noter que le sexe ratio n'était pas non plus affecté par l'alimentation maternelle HFHS (Figure 21.C,  $F(2,29) = 0,0732$ ,  $p = 0,930$ ).

Si l'alimentation maternelle HFHS provoque un stress maternel chez des souris gestantes et en lactation, celui-ci apparaît suffisamment limité dans nos protocoles expérimentaux pour ne pas compromettre l'attention maternelle et l'allaitement pendant les premiers jours de vie.

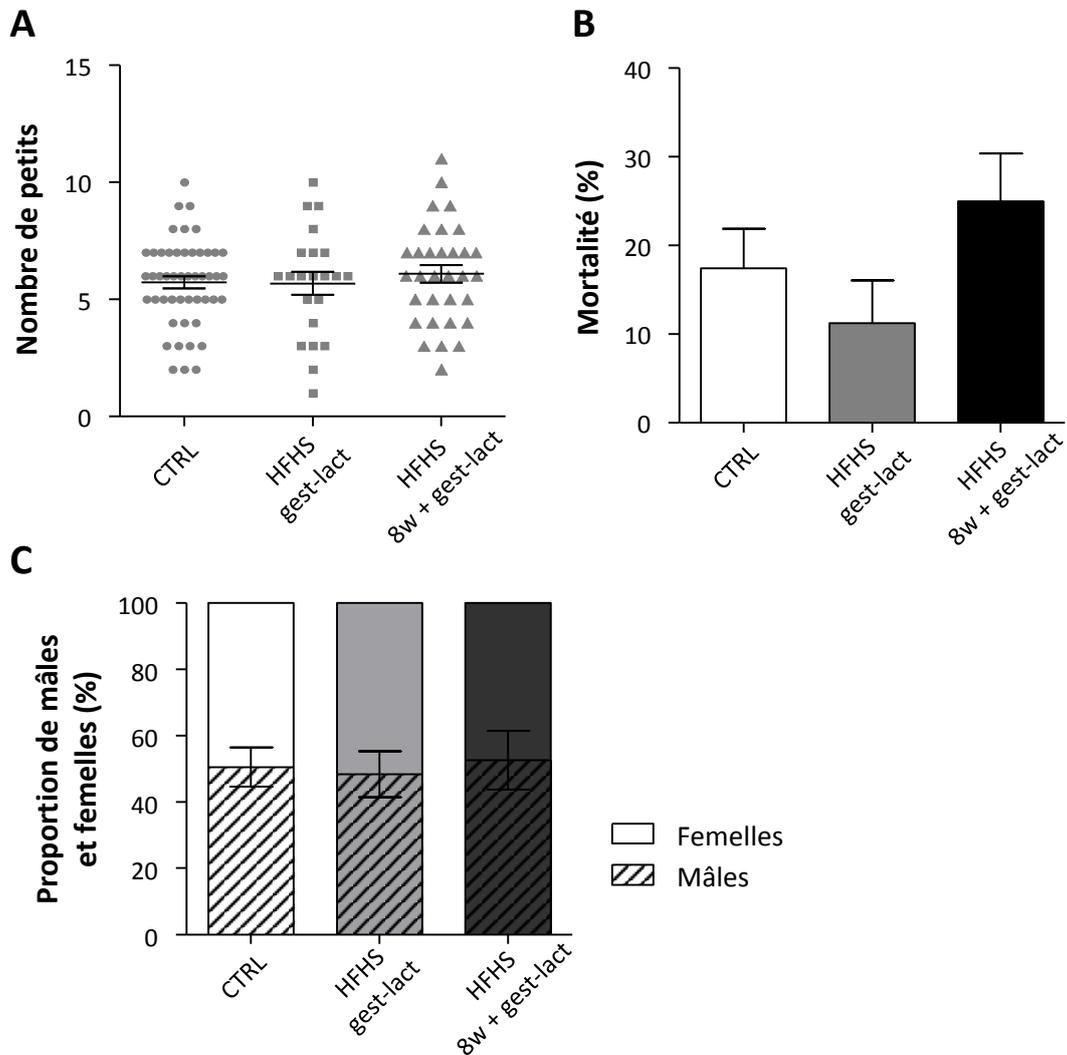


Figure 21 : Caractéristiques des portées issues des femelles sous régime SD ou HFHS

A. Nombre de petits par portées au moment d'observation de la mise bas (CTRL: n=49 portées, HFHS gest-lact: n=22, HFHS 8w + gest-lact: n=32). B. Pourcentage de mortalité dans chaque portées dans les premiers jours qui suivent la mise bas (PND 1 – PND 3, CTRL: n=49 portées, HFHS gest-lact: n=22, HFHS 8w + gest-lact: n=32). C. Sexe ratio au sein des portées (CTRL: n=15 portées, HFHS gest-lact: n=9, HFHS 8w + gest-lact: n=8). Toutes les données sont représentées en moyennes ± sem. L'analyse statistique avec une ANOVA à un facteur (A. et C.) ou un test de Kruskal-Wallis (B.) n'a pas révélé de différences significatives entre les groupes.

#### 4. Impact de l'alimentation HFHS sur la production et la composition du lait maternel

Nous avons ensuite estimé le volume de lait produit par les femelles et évalué sa composition en milieu de lactation dans le but de savoir si les apports nutritionnels des petits étaient modifiés par l'alimentation maternelle HFHS. La composition du lait maternel dépend en effet en grande partie de l'alimentation de la mère pendant la lactation et de sa capacité à synthétiser *de novo* les lipides (Oosting et al. 2015; Wahlig et al. 2012).

Pour évaluer le volume de lait produit par les mères en milieu de lactation, les portées ont été séparées des mères pendant 4h à PND 10. Les cages contenant les portées ont été placées sur des plaques chauffantes pour éviter que la température corporelle des petits ne baisse. Puis les petits ont été pesés et remis avec leur mère pendant 2h, et à nouveau pesés. Ainsi les petits sont privés de nourriture pendant 4h, et la différence de poids mesurée entre la fin des 2h d'allaitement et le début reflète la quantité de lait consommée par les petits et donc le volume de lait produit par les mères.

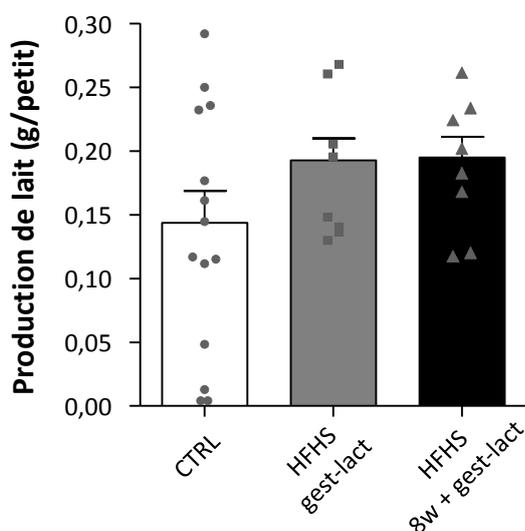


Figure 22 : Evaluation du volume de lait produit en milieu de lactation

Les histogrammes représentent les valeurs moyennes  $\pm$  sem, et les données individuelles sont affichées pour chaque groupe. CTRL: n=14 portées, HFHS gest-lact: n=8, HFHS 8w + gest-lact: n=8. L'analyse statistique avec une ANOVA à un facteur n'a pas révélé de différences significatives entre les groupes.

La quantité de lait consommé était similaire dans les trois groupes (Figure 22,  $F(2,27) = 1,77$ ,  $p = 0,190$ ), montrant ainsi que l'accès au lait et la production de lait maternel n'ont pas été affectés par l'alimentation maternelle HFHS.

Du lait a été prélevé sur d'autres lots de femelles à PND 10 pour mesurer le contenu en lipides, protéines et lactose. Pour ce faire, les portées sont également séparées des mères pendant 4h. Les mères sont ensuite anesthésiées par injection i.p. de Kétamine-Xylazine (70-

14 mg/kg, Sigma-Aldrich), suivie d'une injection d'oxytocine (100 µL, Intervet, Unterschleissheim, Germany) pour induire l'écoulement du lait. Le lait est ensuite prélevé sur les 10 mamelles à l'aide d'une pipette Pasteur en verre surmontée d'une poire de gonflage pour créer une légère aspiration au bout de la pipette. Le lait est collecté dans des eppendorff et stocké à -80 °C.

Pour le dosage des lipides, ils sont extraits du lait par la méthode de Folch puis analysés en chromatographie en phase gazeuse comme décrit précédemment (Thierry et al. 2014).

Le dosage des protéines a été effectué avec un kit basé sur la réaction colorimétrique de Lowry (DC Protein assay, Bio-Rad).

Un protocole pour le dosage du lactose reposant sur une réaction colorimétrique a été mis au point. L'acide 3,5-dinitrosalicylique (DNS) est un composé aromatique qui réagit avec les sucres réducteurs en conditions alcalines et sous chauffage, pour former l'acide 3-amino-5-nitrosalicylique qui absorbe fortement la lumière à 540 nm (Sumner & Noback 1924). Le réactif au DNS a été préparé dans de l'eau distillée comme suit : 43,2 mM de DNS (Alfa Aesar), 1,06 M de tartrate double de potassium et sodium (sel de Rochelle ou sel de Seignette,  $C_4H_4KNaO_6$ , MP Biomedicals), et 4 % en volume d'hydroxyde de sodium (NaOH 30 %, RP normapur, Prolabo). Une gamme de lactose a été préparée dans de l'eau distillée également, les concentrations des solutions étaient comprises entre 0 et 500 µg/mL. Les échantillons de lait ont été dilués 100 fois. 20 µL du réactif au DNS ont été ajoutés à 30 µL d'échantillon de lait dilué ou de solution de lactose. Les mélanges ont été incubés à 100 °C pendant 5 min, puis refroidis sur de la glace. Après ajout de 150 µL, l'absorbance à 540 nm a été mesurée.

Les lipides, protéines et le lactose ont été dosés en mg/mL de solution puis exprimés en pourcentage du poids de lait. Les résultats de dosages sont présentés dans le [Tableau 2](#) et la composition lipidique est détaillée dans le [Tableau 3](#) en comparaison avec la composition lipidique des régimes utilisés.

Les teneurs en protéines et lactose dans le lait maternel étaient similaires dans les trois groupes de femelles ([Tableau 2](#), protéines :  $K = 0,987$ ,  $p = 0,611$  ; lactose :  $K = 0,007$ ,  $p = 0,997$ ). Le pourcentage de lipides totaux était également similaire entre les laits des femelles sous régime HFHS et le lait des femelles sous alimentation SD ( $K = 4,987$ ,  $p = 0,0826$ ). En revanche, la composition en acides gras a été impactée par l'alimentation maternelle HFHS.

Le lait des femelles ayant commencé à consommer de l'aliment HFHS deux mois avant la gestation tout comme le lait des femelles mise sous alimentation HFHS à partir de la gestation seulement contenait moins d'AGS, beaucoup plus d'acides gras mono-insaturés (AGMI), et moins d'AGPI avec un ratio n-6 / n-3 plus élevé, par rapport au lait des femelles sous alimentation SD.

	CTRL	HFHS gest-lact	HFHS 8w + gest-lact
<b>Lipides (% poids)</b>	<b>23,42 ± 0,97</b>	<b>26,63 ± 1,35</b>	<b>25,83 ± 1,45</b>
AGS (% lipides totaux)	56,07 ± 1,29	48,98 ± 1,57***	43,25 ± 1,58**
AGMI (% lipides totaux)	25,61 ± 0,99	45,47 ± 1,39***	43,30 ± 1,51**
AGPI (% lipides totaux)	18,32 ± 0,41	13,55 ± 0,22**	13,46 ± 0,35**
- n-6 (% AGPI totaux)	16,45 ± 0,38	12,42 ± 0,21**	12,27 ± 0,32**
- n-3 (% AGPI totaux)	1,78 ± 0,05	1,03 ± 0,02**	1,10 ± 0,31**
- ratio n-6 / n-3	9,27 ± 0,22	12,10 ± 0,32***	11,22 ± 0,31**
<b>Protéines (% poids)</b>	<b>21,58 ± 0,99</b>	<b>20,86 ± 0,53</b>	<b>21,25 ± 1,22</b>
<b>Lactose (% poids)</b>	<b>3,10 ± 0,43</b>	<b>2,90 ± 0,37</b>	<b>3,29 ± 0,74</b>

Tableau 2 : Composition du lait maternel à PND 10

Les données représentent les valeurs moyennes ± sem. CTRL: n=12 femelles, HFHS gest-lact: n=6, HFHS 8w + gest-lact: n=6. \*\* p < 0,01, \*\*\* p < 0,001 versus CTRL après un test de Kruskal-Wallis suivi de comparaisons multiples de Dunn.

AGS : acides gras saturés, AGMI : acides gras mono-insaturés, AGPI : acides gras poly-insaturés.

Si l'on se penche plus précisément sur la composition lipidique, nous pouvons remarquer que la proportion d'AGMI et d'AGPI dans le lait maternel reflète plutôt bien la proportion de ces classes de lipides dans le régime HFHS (Tableau 3). Le pourcentage d'AGMI est presque deux fois plus élevé dans l'aliment HFHS par rapport à l'aliment SD, et l'on retrouve une augmentation similaire dans les laits des femelles des groupes HFHS par rapport aux femelles du groupe CTRL. Le régime HFHS est très déficient en AGPI comparé au régime SD, et la proportion d'AGPI est plus faible dans les laits des femelles HFHS que dans les laits des femelles CTRL.

En revanche, les laits des femelles sous alimentation HFHS contiennent un peu moins d'AGS que les laits des femelles CTRL alors que le régime HFHS en contient deux fois plus que le régime SD.

	CTRL	HFHS gest-lact	HFHS 8w + gest-lact	SD	HFHS
<b>Total AGS</b>	<b>56,07 ± 1,29</b>	<b>40,98 ± 1,57***</b>	<b>43,25 ± 1,58**</b>	<b>18,52</b>	<b>37,05</b>
10:0	3,52 ± 0,15	1,87 ± 0,19***	2,08 ± 0,18**	-	-
12:0	7,11 ± 0,27	3,40 ± 0,33**	3,76 ± 0,27**	0,09	0,11
14:0	11,31 ± 0,38	5,59 ± 0,49***	6,16 ± 0,38**	0,52	1,26
15:0	0,10 ± 0,004	0,08 ± 0,002**	0,07 ± 0,003***	0,11	0,07
16:0	31,31 ± 0,63	26,21 ± 0,64**	26,94 ± 0,72*	13,77	23,06
17:0	0,09 ± 0,004	0,14 ± 0,005**	0,15 ± 0,01***	0,12	0,29
18:0	2,53 ± 0,05	3,61 ± 0,22**	4,01 ± 0,29***	3,18	12,00
20:0	0,09 ± 0,01	0,09 ± 0,004	0,09 ± 0,01	0,31	0,21
22:0	-	-	-	0,27	0,07
24:0	-	-	-	0,17	-
<b>Total AGMI</b>	<b>25,61 ± 0,99</b>	<b>45,47 ± 1,39***</b>	<b>43,30 ± 1,51**</b>	<b>23,62</b>	<b>44,65</b>
14:1	0,15 ± 0,01	0,05 ± 0,01**	0,06 ± 0,01**	-	-
16:1 (n-9)	0,26 ± 0,01	0,43 ± 0,01***	0,41 ± 0,02**	-	0,32
16:1 (n-7)	2,45 ± 0,10	2,64 ± 0,10	2,44 ± 0,13	0,67	2,18
18:1 (t)	0,46 ± 0,05	0,60 ± 0,03**	0,50 ± 0,02	0,13	0,30
18:1 (n-9)	19,39 ± 0,80	37,15 ± 1,20***	35,49 ± 1,24**	19,88	38,10
18:1 (n-7)	2,24 ± 0,08	3,59 ± 0,08***	3,44 ± 0,11**	1,25	3,03
20:1 (n-9)	0,59 ± 0,02	0,95 ± 0,04**	0,90 ± 0,04**	0,87	0,73
22:1 (n-9)	-	-	-	0,72	-
24:1 (n-9)	0,08 ± 0,003	0,06 ± 0,002*	0,06 ± 0,004	0,12	-
<b>Total AGPI</b>	<b>18,32 ± 0,41</b>	<b>13,55 ± 0,22**</b>	<b>13,46 ± 0,35**</b>	<b>57,78</b>	<b>18,31</b>
20:3 (n-9)	0,09 ± 0,01	0,10 ± 0,01	0,09 ± 0,01	-	-
Total n-6	16,45 ± 0,38	12,42 ± 0,21**	12,27 ± 0,32**	50,91	16,76
18:2 (n-6)	13,91 ± 0,33	9,99 ± 0,19**	10,05 ± 0,30**	50,67	15,97
18:3 (n-6)	0,20 ± 0,01	0,21 ± 0,02	0,17 ± 0,01	-	-
20:2 (n-6)	0,76 ± 0,01	0,61 ± 0,02**	0,61 ± 0,03**	0,14	0,46
20:3 (n-6)	0,63 ± 0,02	0,55 ± 0,02	0,48 ± 0,03**	-	0,09
20:4 (n-6)	0,74 ± 0,03	0,84 ± 0,04	0,76 ± 0,07	0,10	0,17
22:4 (n-6)	0,21 ± 0,01	0,22 ± 0,01	0,21 ± 0,02	-	0,07
Total n-3	1,78 ± 0,05	1,03 ± 0,02**	1,10 ± 0,31**	6,77	1,56
18:3 (n-3)	1,01 ± 0,03	0,63 ± 0,02***	0,71 ± 0,05**	5,27	1,56
20:5 (n-3)	0,23 ± 0,01	0,14 ± 0,01**	0,13 ± 0,01***	0,54	-
22:5 (n-3)	0,22 ± 0,01	0,12 ± 0,004**	0,12 ± 0,004***	-	-
22:6 (n-3)	0,33 ± 0,02	0,14 ± 0,01**	0,14 ± 0,01**	0,96	-
<i>Ratio n-6/n-3</i>	<i>9,27 ± 0,22</i>	<i>12,10 ± 0,32***</i>	<i>11,22 ± 0,31**</i>	<i>7,53</i>	<i>10,78</i>

Tableau 3 : Composition lipidique détaillée du lait maternel à PND 10 et des régimes utilisés

Les données représentent les valeurs moyennes ± sem, et correspondent au pourcentage des AG totaux. CTRL: n=12 femelles, HFHS gest-lact: n=6, HFHS 8w + gest-lact: n=6. \* p < 0,05, \*\* p < 0,01, \*\*\* p < 0,001 versus CTRL après un test de Kruskal-Wallis suivi de comparaisons multiples de Dunn.

Une étude publiée en 2015 a cherché à savoir si le fait de modifier la composition en AG de l'alimentation maternelle pendant la lactation pouvait permettre une manipulation de la composition lipidique du lait maternel (Oosting et al. 2015). En utilisant quatre régimes expérimentaux, les auteurs ont montré que la composition en AGPI du lait maternel pouvait être rapidement et spécifiquement modulée en modifiant l'alimentation maternelle. Le contenu en AGMI serait par contre plutôt indépendant de la composition des lipides alimentaires.

Nous montrons ici que dans le lait maternel, toutes les classes d'AG ont été affectées par l'alimentation maternelle HFHS. Cette discordance avec l'étude précédente peut provenir de la différence de composition des régimes expérimentaux utilisés. Quoiqu'il en soit, l'apport nutritionnel des petits provenant de mères sous aliment HFHS était différent de celui des petits provenant de mères CTRL. Même si le volume de lait consommé et la teneur en lipides, protéines et lactose du lait maternel étaient similaires entre les trois groupes, les petits HFHS ont été différemment exposés aux AG.

#### 5. Bilan sur l'état métabolique des mères sous alimentation HFHS

Avec nos trois groupes de femelles, nous avons donc pu étudier l'effet de l'alimentation HFHS pendant les périodes de développement fœtal et postnatal (groupe HFHS gest-lact), ainsi que l'effet d'un contexte métabolique maternel légèrement altéré et associé à l'ingestion d'aliment HFHS pendant deux mois et pendant la gestation et la lactation (groupe HFHS 8w + gest-lact).

La lactation et les comportements maternels ne semblent pas compromis par la mise sous alimentation HFHS. Pendant la gestation, les fœtus des mères sous aliment HFHS sont exposés au gras et au sucre, enrichis dans l'alimentation de leur mère donc probablement enrichis dans le milieu intra-utérin. Pendant la lactation, les petits issus de mères sous alimentation HFHS ont reçu des apports lipidiques différents en termes de composition en AG par rapport aux petits issus de mères sous alimentation SD.

Dans le point suivant, nous avons voulu caractériser les petits issus des trois groupes de femelles d'un point de vue morphologique et métabolique.

## II. Impact métabolique de l'alimentation maternelle HFHS sur la progéniture

Les caractéristiques métaboliques des petits provenant des trois groupes de femelles sont regroupées dans la Figure 23.

Premièrement, nous avons analysé les courbes de croissance des petits. Les portées ont été pesées à PND 1, puis le poids individuel des souriceaux a été mesuré deux fois par semaine jusqu'au sevrage. Les nouveau-nés provenant d'une mère sous alimentation HFHS avaient un poids similaire aux nouveau-nés du groupe CTRL (Figure 23.A,  $K = 2,285$ ,  $p = 0,319$ ), et ont développé un surpoids en cours de lactation (Figure 23.B,  $F(2,175) = 16,81$ ,  $p < 0,001$ ). A PND 15, les petits du groupe HFHS gest-lact présentaient un surpoids de 10,3 % par rapport aux petits du groupe CTRL ( $p < 0,01$ ), et les petits du groupe HFHS 8w + gest-lact un surpoids de 11,5 % ( $p < 0,05$ ). En fin de lactation (PND 21), ce surpoids s'élevait à 13,1 % ( $p < 0,001$ ) pour le groupe HFHS gest-lact et à 11,1 % pour le groupe HFHS 8w + gest-lact ( $p < 0,001$ ).

Un lot de souris a été sacrifié au moment du sevrage par étourdissement à l'isoflurane puis décapitation pour ensuite disséquer, prélever et peser la masse grasse viscérale présente autour de l'épididyme. Les progénitures des femelles nourries avec le régime HFHS présentaient des masses graisseuses épидидymaires plus importantes que les progénitures des femelles sous alimentation SD (Figure 23.C, x2,2 pour le groupe HFHS gest-lact et x2,8 pour le groupe HFHS 8w + gest-lact par rapport au groupe CTRL,  $K = 25,08$ ,  $p < 0,001$ ).

Sur d'autres souris, du sang a été collecté sans anesthésie préalable à partir de la veine de la queue, puis centrifugé pour obtenir du plasma. Les taux de leptine plasmatique ont été déterminés à l'aide d'un kit de dosage commercial (Mouse Leptin ELISA Kit, Crystal Chem, #90030). Les résultats de dosage montrent une hyperleptinémie chez les petits des deux groupes HFHS, ce qui est en accord avec les quantités de masse grasse plus importantes chez ces petits (Figure 23.D, x1,8 pour le groupe HFHS gest-lact et x2 pour le groupe HFHS 8w + gest-lact par rapport au groupe CTRL,  $K = 11,36$ ,  $p < 0,01$ ).

Pour investiguer le métabolisme des petits de 3 semaines, un ipGTT a été effectué comme décrit précédemment (Bowe et al. 2014). Après 5h de jeûne, la glycémie basale des petits des trois groupes était similaire (Figure 23.E,  $F(2,36) = 2,31$ ,  $p = 0,114$ ). L'injection d'un

bolus de glucose en i.p. (2g/kg de poids corporel) a entraîné des cinétiques similaires pour l'évolution de la glycémie au cours du temps dans les trois groupes (Figure 23.F,  $F(2,36) = 0,711$ ,  $p = 0,498$ ).

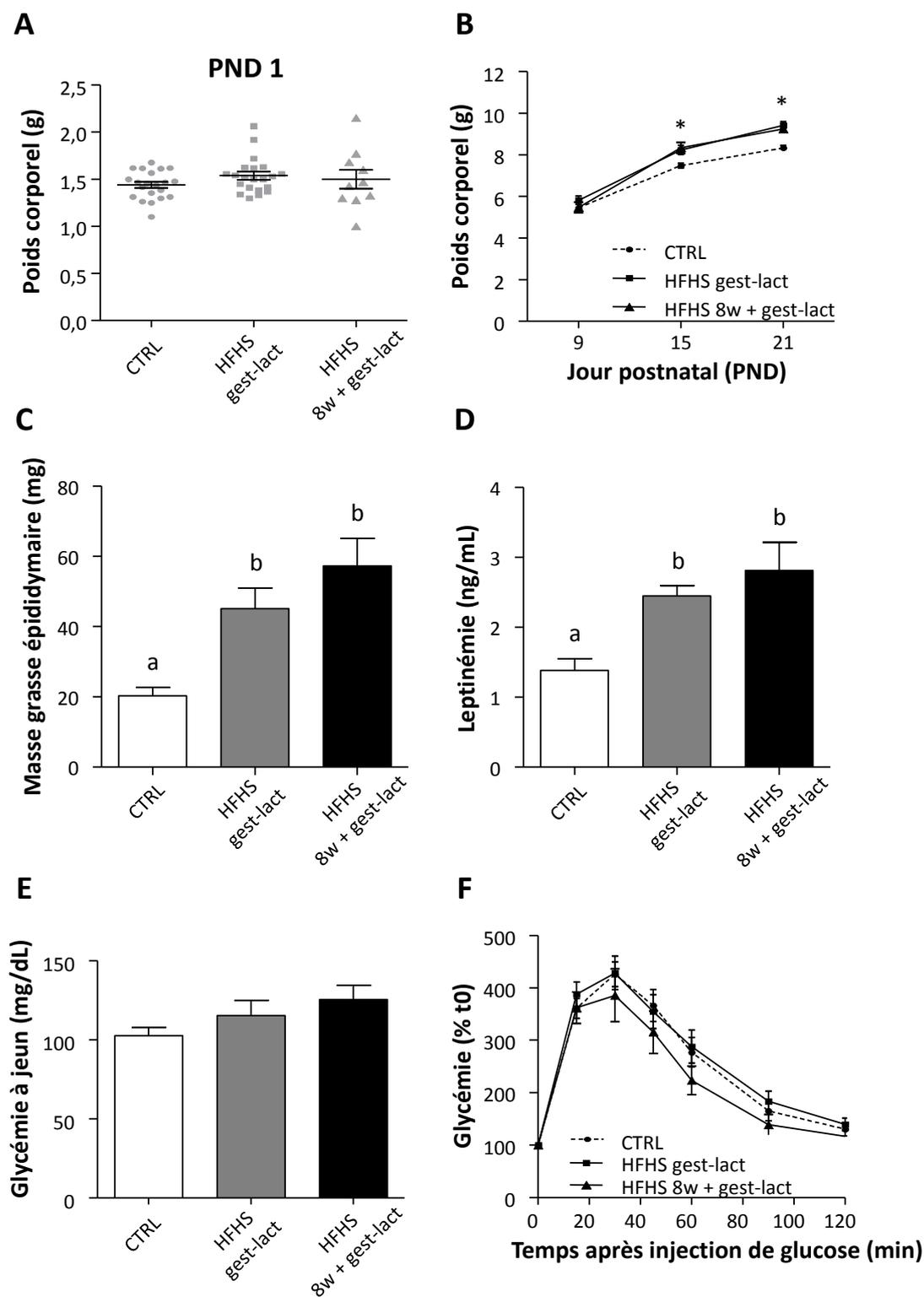


Figure 23 : Conséquences métaboliques de l'alimentation maternelle HFHS sur les petits

A. Poids des petits un jour après la naissance (CTRL : n=21 portées, HFHS gest-lact : n=21, HFHS 8w + gest-lact : n=10). B. Evolution du poids des mâles pendant la lactation (au moins 10 petits par groupe et par jour, \*  $p < 0,05$  HFHS gest-lact vs CTRL ou HFHS 8w + gest-lact vs CTRL). C. Quantité de masse graisseuse prélevée autour de l'épididyme (CTRL : n=37 petits, HFHS gest-lact : n=16, HFHS 8w + gest-lact : n=19, les valeurs avec différentes lettres diffèrent significativement ( $a \neq b$ )). D. Teneur en leptine circulante (CTRL : n=10 petits, HFHS gest-lact : n=6, HFHS 8w + gest-lact : n=6, les valeurs avec différentes lettres diffèrent significativement ( $a \neq b$ )). E. Glycémie mesurée après une mise à jeun de 5h (CTRL : n=18 petits, HFHS gest-lact : n=12, HFHS 8w + gest-lact : n=9). F. Evolution de la glycémie pendant 2h après injection i.p. d'un bolus de glucose (2g/kg) suite à une mise à jeun de 5h (CTRL : n=18 petits, HFHS gest-lact : n=12, HFHS 8w + gest-lact : n=9). Toutes les données sont représentées en moyennes  $\pm$  sem avec représentation des données individuelles pour le poids à PND 1 (A). L'analyse statistique a été faite avec un test de Kruskal-Wallis suivi de comparaisons multiples de Dunn pour les figures A, C, D et E ; et avec une ANOVA à deux facteurs sur mesures répétées suivie de comparaisons multiples de Bonferroni pour les figures B et F.

L'exposition périnatale au sucre et au gras apportée par nos deux designs expérimentaux affecte peu la physiologie métabolique de la progéniture, phénomène ayant déjà été rapporté dans la littérature (Chin et al. 2017).

Les petits des deux groupes HFHS développent néanmoins un surpoids au cours de la lactation. Nous n'avons pas observé de différence dans la quantité estimée de lait consommée par les petits à PND 10, et la composition globale en lipides, protéines et lactose était similaire dans les laits des mères des trois groupes. Par conséquent, le gain de poids observé chez les progénitures HFHS de PND 15 à PND 20 pourrait provenir soit d'une plus faible dépense énergétique (métabolisme basal et thermogénèse), soit d'un démarrage de l'alimentation solide autonome plus précoce à partir de la nourriture de la mère ; plutôt que d'un apport énergétique supérieur à travers le lait maternel.

Il a été rapporté chez des rats que la progéniture issue de mères recevant une alimentation HFHS développait un surpoids avant le sevrage dû à une augmentation de leur alimentation solide autonome en fin de lactation (Kojima et al. 2016). Pour expliquer ces observations, les auteurs proposent l'hypothèse selon laquelle les signaux de satiété induits par l'ingestion de lait seraient moins efficaces chez les petits provenant de mères sous aliment HFHS, ce qui inciterait plus les petits à chercher de l'alimentation solide après une tétée.

Ce phénomène constituerait un biais dans notre protocole qui vise à étudier les effets de l'alimentation maternelle et non les effets de l'alimentation directe. Néanmoins, la période d'alimentation autonome s'étendrait sur les quelques jours précédant le sevrage, période réduite en comparaison avec la durée totale du protocole (21 jours de gestation et 21 jours de lactation, plus éventuellement 8 semaines de pré-exposition).

A 3 semaines de vie, le surpoids des petits provenant des mères sous régime HFHS s'accompagnait d'un excès de masse grasse épидидymaire et de taux de leptine circulante plus élevés. Nous remarquons également que les valeurs des paramètres morphologiques et métaboliques mesurés chez les petits étaient systématiquement similaires entre les deux groupes HFHS. Dans le groupe HFHS 8w + gest-lact, le fait que les mères aient ingéré l'aliment HFHS pendant 2 mois et leur intolérance au glucose avant la mise en couple ne semblent pas avoir induit d'altérations métaboliques supplémentaires chez les petits par rapport au groupe HFHS gest-lact. Ainsi dans notre protocole, le contexte métabolique des mères avant la gestation semble avoir un impact mineur sur la physiologie métabolique de la progéniture au sevrage. En revanche, les périodes de gestation et de lactation constitueraient des périodes critiques avec un impact fort de l'alimentation maternelle sur les paramètres morphologiques et métaboliques des petits.

Nous pouvons donc dire que nos deux protocoles de mise sous alimentation maternelle HFHS induisent à un stade très précoce des perturbations métaboliques chez la progéniture mâle au sevrage. Compte tenu de l'influence métabolique certaine sur le système olfactif, qu'en est-il de leurs capacités olfactives ?

# Objectif 2 : Etude du comportement olfactif

---

Pour évaluer les performances olfactives chez nos souriceaux de 3 semaines, il a fallu mettre en place des tests comportementaux adaptés aux jeunes souris.

Nous avons d'abord cherché à étudier les capacités olfactives générales des souriceaux en utilisant un test de nourriture enfouie ou *buried food test*, impliquant ainsi la perception d'une odeur alimentaire. Puis nous nous sommes penchés sur le comportement de flairage induit par une odeur non alimentaire mais attractive.

## I. Capacités olfactives générales envers une odeur alimentaire

Le test de nourriture enfouie repose sur la tendance naturelle des rongeurs à utiliser les indices olfactifs pour trouver leur nourriture. Ce test a été décrit par Yang et Crawley en 2009 (Yang & Crawley 2009) : il consiste à cacher un morceau de nourriture dans la litière d'une cage classique de souris, pour ensuite mesurer le temps mis par la souris préalablement mise à jeun pour retrouver la nourriture. Ainsi, la souris n'a d'autre choix que d'utiliser les odeurs pour se guider au sein de la cage et accéder à la récompense alimentaire. Plus la souris mettra de temps à retrouver le morceau de nourriture, plus elle sera susceptible de présenter des déficits olfactifs. En comparant les performances des petits des groupes HFHS gest-lact et HFHS 8w + gest-lact avec les petits du groupe CTRL, nous pourrons alors déterminer si l'alimentation maternelle affecte ou non la capacité de détection d'une odeur alimentaire, dans un contexte de recherche de nourriture, chez la progéniture.

### 1. Protocole

Le protocole initial de Yang et Crawley a été mis en place pour évaluer les performances olfactives de souris âgées de 6 semaines minimum. Il a donc fallu apporter des modifications pour adapter ce test à nos souris juvéniles (3 semaines).

Le stimulus alimentaire choisi a été des céréales chocolatées (Crunch<sup>®</sup>, Nestlé). Ces céréales sont fabriquées à partir de blé, aliment naturel des souris, et contiennent du chocolat, très appétant pour les souris. Bien que cet aliment semble palatable pour les souris, il constitue un objet complètement nouveau pour les souriceaux de notre protocole.

Une étape d'habitation au Crunch a donc été mise en place avant de réaliser le test de nourriture enfouie afin de familiariser les souriceaux à ce nouvel objet alimentaire et d'éviter les phénomènes de néophobie alimentaire le jour du test.

#### *a) Procédure d'habitation au Crunch*

Le test de nourriture enfouie était effectué le jour du sevrage des petits. Trois jours avant le jour du test, les mâles de chaque portée testée ont été quotidiennement séparés de leur mère pendant 2h pour être habitués à l'objet alimentaire. Par la même occasion, les mâles s'accoutumaient à la séparation maternelle et à l'environnement des cages utilisées le jour du test. Lors des trois jours consécutifs d'habitation, les mâles suivaient la même procédure :

- 1h de séparation maternelle : tous les mâles d'une même portée étaient placés dans une cage classique d'élevage (« cage collective »), avec accès à l'eau mais sans nourriture.
- 30 min d'exposition collective au Crunch : des morceaux de céréales ont été introduits dans la cage collective.
- 30 min d'exposition individuelle au Crunch et à la cage de test : chaque mâle était placé dans une cage d'élevage (33x19x13 cm) contenant 6 cm de litière (« cage individuelle »), avec une autre cage identique retournée en guise de couvercle, et en présence de morceaux de Crunch.

A la fin de la procédure, les mâles étaient remis dans la cage d'élevage de leur mère.

La litière des cages individuelles et collectives n'était pas changée, ni au cours de l'habitation ni pour le test, afin que les souris reconnaissent les odeurs déposées pendant la phase d'habitation et soient le moins stressées possible le jour du test.

Les quantités de Crunch consommées pendant les périodes d'exposition collective et individuelle ont été mesurées chaque jour. Après le dernier jour d'habitation, nous avons vérifié que tous les mâles avaient mangé du Crunch au moins une fois au cours du processus d'habitation.

#### *b) Déroulement du test de nourriture enfouie*

Le jour du test, les mâles étaient séparés de leur mère, placés dans leur cage collective et laissés sans nourriture pendant 5h. Cette mise à jeun modérée avait pour but de motiver les souriceaux à chercher de la nourriture.

Le test était effectué dans les cages individuelles respectives des individus et comprenait 3 essais, espacés de temps de repos de 3 min. Pour le premier essai, un morceau de Crunch (0,07 – 0,09 g) était positionné sur la surface de la litière dans l'un des 8 cadrans choisi au hasard (Figure 24), puis le souriceau était introduit au centre de la cage. Le temps mis par l'individu pour atteindre et commencer de manger le morceau était mesuré, puis le morceau était immédiatement retiré pour empêcher la souris de le manger entièrement afin d'éviter d'induire le rassasiement.

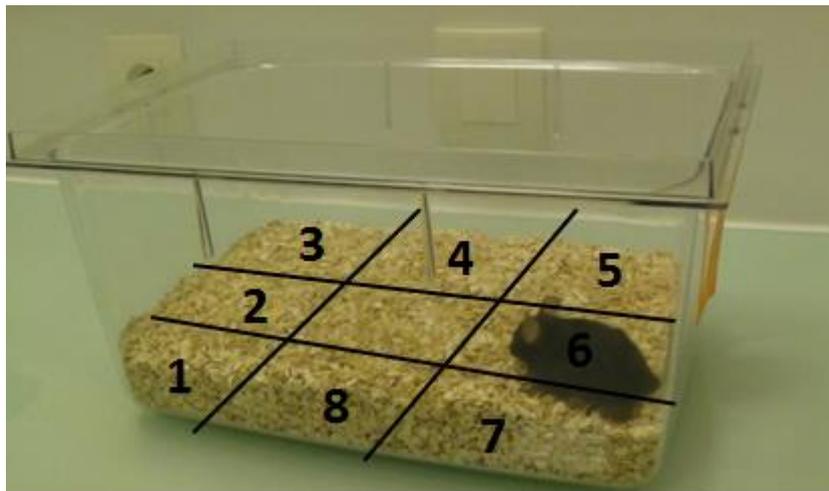


Figure 24 : Représentation des 8 cadrans définis au sein des cages individuelles utilisées pour le test de nourriture enfouie

Ce premier essai avec la céréale visible ne présentait aucune difficulté et servait à évaluer la motivation des souriceaux à manger spécifiquement cet aliment. Une motivation suffisante et équivalente au sein des trois groupes de souriceaux était nécessaire pour la bonne poursuite du test.

Les deux essais suivants sont conduits de la même manière, mais en enfouissant le morceau de Crunch sous 2 cm de litière au lieu de le poser sur la surface. Chacun des deux derniers essais se terminait lorsque le souriceau avait trouvé la céréale et commençait de la grignoter, ou bien au bout de 10 min s'il ne trouvait pas le morceau. Le meilleur temps sur ces deux essais a été calculé pour évaluer la performance olfactive de chaque souriceau.

### *c) Contrôle du comportement de fouissage*

Le test de nourriture enfouie repose sur la capacité des souris à trouver un morceau de nourriture caché sous la litière. Il est donc nécessaire pour la souris de se déplacer et de creuser pour retrouver l'aliment enfoui. Sur des lots d'animaux différents de ceux utilisés pour le test de nourriture enfouie en lui-même, nous avons réalisé une observation comportementale dans le but d'évaluer l'activité de fouissage des petits. Comme précédemment, les souriceaux étaient habitués au Crunch pendant 3 jours. Le 4<sup>ème</sup> jour, les souriceaux étaient également mis à jeun pendant 5h et l'essai avec la céréale visible était réalisé. Ensuite, la souris était réintroduite dans sa cage de test mais sans déposer de céréale, ni sur la litière ni enfouie dedans. Pendant 10 min, 4 comportements basiques ont été suivis grâce au logiciel de quantification comportementale JWatcher : 1) exploration superficielle de la litière ou exploration des parois de la cage, 2) fouissage actif dans la litière, 3) toilettage, 4) immobilité. Les temps relatifs à chacun des comportements sur les 10 min ont ensuite été calculés.

## 2. Résultats et interprétation

Le régime maternel HFHS n'a pas affecté le temps mis par les souriceaux pour retrouver la céréale visible lors de l'essai 1 (Figure 25.A,  $K = 3,855$ ,  $p = 0,146$ ). Les petits des 3 groupes mettaient environ 10 sec pour aller vers la céréale et commencer de la grignoter. Ainsi nous pouvons dire que notre protocole d'habituation au Crunch a bien fonctionné et que les souriceaux des 3 groupes étaient très motivés pour atteindre cette récompense alimentaire au moment du test.

En revanche, lorsque la céréale était enfouie (essais 2 et 3), les petits des deux groupes HFHS mettaient significativement plus de temps ( $\times 1,9$ ) que les petits du groupe CTRL pour retrouver le morceau (Figure 25.B,  $K = 12,92$ ,  $p = 0,0016$ ). Nous n'avons pas révélé de différence de performance significative entre le groupe de petits HFHS gest-lact et le groupe HFHS 8w + gest-lact.

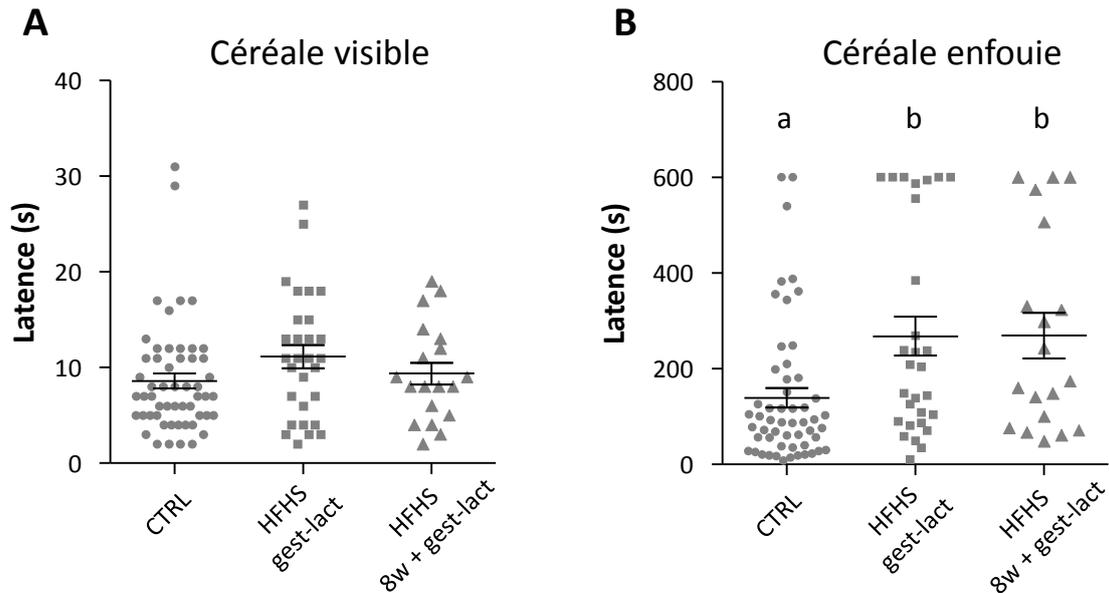


Figure 25 : Performance olfactive évaluée par un test de nourriture enfouie

A. Temps mis par les souris pour retrouver le morceau de Crunch visible, posé sur la litière (essai 1). B. Temps mis par les souris pour retrouver le morceau de Crunch enfoui (meilleur temps des essais 2 et 3). CTRL : n=54, HFHS gest-lact : n=29, HFHS 8w + gest-lact : n=19. Les barres horizontales et barres d'erreur représentent les moyennes  $\pm$  sem avec représentation des données individuelles sous forme de symboles. Les valeurs avec différentes lettres diffèrent significativement après un test de Kruskal-Wallis suivi de comparaisons multiples de Dunn ( $a \neq b$ ).

Pour vérifier que cet effet était dû à des différences de capacités olfactives et non à des différences de comportement spontané de fouissage, nous avons réalisé une observation comportementale dans un contexte identique mais en l'absence d'objet alimentaire lors du test (Figure 26).

En 10 min d'observation, les proportions des comportements spontanés étaient très similaires entre les trois groupes. Plus précisément, les souriceaux passaient environ 20 % du temps total à creuser dans la litière (CTRL : 22,22 %, HFHS gest-lact : 19,95 %, HFHS 8w + gest-lact : 18,83 %,  $F(2,46) = 0,341$ ,  $p = 0,713$ ) et plus de 70 % du temps à explorer la surface de la litière ou la partie supérieure de la cage (CTRL : 73,12 %, HFHS gest-lact : 71,94 %, HFHS 8w + gest-lact : 72,92 %,  $F(2,46) = 0,0371$ ,  $p = 0,964$ ).

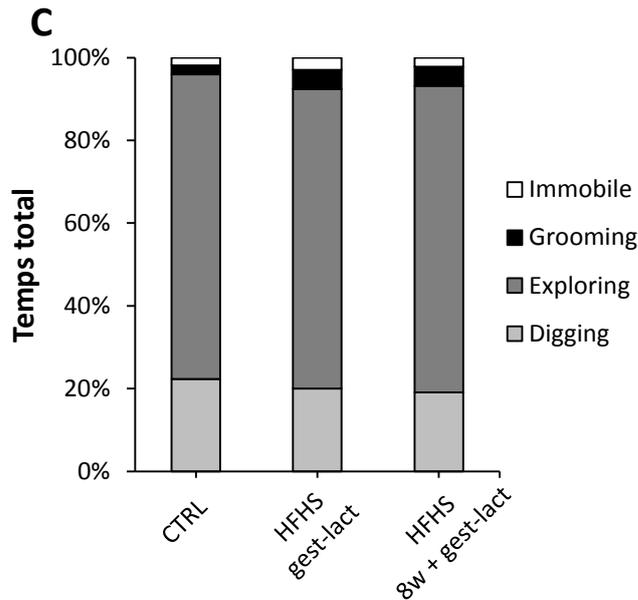


Figure 26 : Quantification de 4 comportements basiques sur une période libre de 10 min

Les proportions moyennes du temps passées à rester immobile, se toiletter, explorer la partie superficielle de la litière et creuser dans la litière (fouissage) sont représentées pour chaque groupe. CTRL : n=26, HFHS gest-lact : n=12, HFHS 8w + gest-lact : n=11. L'analyse statistique avec une ANOVA à un facteur pour chacun des comportements n'a pas révélé de différences significatives entre les groupes.

Dans cette procédure, l'alimentation maternelle HFHS n'a pas impacté la motivation à chercher la céréale, ni le comportement naturel de fouissage. La latence supérieure pour retrouver le Crunch enfoui observée chez les petits provenant de mères sous alimentation HFHS peut donc bien être attribuée à un déficit olfactif.

Cependant, deux facteurs supplémentaires pourraient biaiser cette conclusion et n'ont pas été mesurés directement.

Premièrement, les états de stress et d'anxiété peuvent induire des comportements d'hyperactivité ou au contraire des attitudes de prostration. Les individus stressés ne seraient alors pas focalisés sur la tâche de recherche de nourriture, ce qui produirait des résultats aberrants. Même si toutes les précautions ont été prises pour réduire au maximum les sources de stress (manipulation dans le calme, litières inchangées depuis le début de l'habituation jusqu'au test), les petits des groupes HFHS pourraient présenter un état de stress chronique par rapport aux petits CTRL. L'obésité maternelle et les complications médicales associées constituent en effet des facteurs de risque d'anxiété et de dépression

chez la progéniture (Sullivan et al. 2015). Il a été montré chez le rongeur que l'ingestion d'une alimentation HFHS pendant la gestation augmentait l'inflammation cérébrale chez la progéniture et induisait à long terme un comportement anxieux (Bilbo & Tsang 2010; Peleg-raibstein et al. 2012).

Bien que nous n'ayons pas réalisé de tests spécifiques pour évaluer le stress et les états d'anxiété ou de dépression chez les petits, notre observation comportementale libre pendant 10 min a révélé des temps similaires pour exercer les 4 comportements basiques au sein des 3 groupes de petits (Figure 26). Les petits des groupes HFHS n'étaient pas plus immobiles ou actifs que les petits CTRL. Nous admettons donc que nos protocoles d'alimentation maternelle HFHS n'ont pas induit de stress particulier chez la progéniture.

Deuxièmement, il est nécessaire que les petits soient suffisamment en état de faim au moment du test pour qu'ils se concentrent sur la tâche de recherche de nourriture. Cependant, un état de faim trop important peut affaiblir l'animal et diminuer sa locomotion, ce qui augmenterait sa latence pour retrouver le morceau de nourriture, indépendamment des composantes motivationnelles. On peut donc se poser la question de la sensibilité des petits HFHS à la privation de nourriture pendant 5h par rapport aux petits CTRL. Chez le rat, l'exposition de femelles à une alimentation de type « cafétéria » (riche en graisses et en sucres) pendant leur lactation provoque une perturbation du comportement alimentaire de la descendance à l'âge adulte, probablement liée à une modification des signaux satiétogènes (Wright et al. 2011). Ainsi, la progéniture de femelles sous alimentation HFHS pourrait présenter une hypersensibilité au jeûne prolongé. Dans notre test, la mise à jeun durait 5h, ce qui est assez court par rapport aux tests classiques de nourriture enfouie (généralement 12h ou toute la nuit (Yang & Crawley 2009) mais suffisant pour que les souriceaux soient motivés à chercher la céréale. Lors des tests de tolérance au glucose effectués sur d'autres lots de souris, une privation de nourriture de 5h était également réalisée. Comme nous l'avons souligné dans le chapitre précédent, la glycémie de base des souriceaux était similaire au sein des 3 groupes après 5h de jeûne (Figure 23). Ainsi, nous pouvons supposer que les petits HFHS étaient dans un état métabolique similaire aux petits CTRL suite à la privation de nourriture, et que la sensibilité au jeûne ne semble pas avoir interféré avec les résultats du test de nourriture enfouie.

Nous avons conclu de cette première approche comportementale que les petits HFHS présentaient une plus grande difficulté à utiliser les indices olfactifs pour retrouver un morceau de nourriture. Une altération de la capacité de détection d'une odeur alimentaire a donc été mise en évidence chez ces petits. Cette altération semblait similaire entre les groupes HFHS gest-lact et HFHS 8w + gest-lact.

Par la suite, nous avons voulu déterminer si la perception d'une odeur non alimentaire était également perturbée chez les souriceaux provenant de mères sous alimentation HFHS.

## II. Comportement de flairage induit par une odeur non alimentaire

Plusieurs tests ont été mis au point chez le rongeur pour évaluer les capacités olfactives en mesurant des seuils de détection odorante (plus petite intensité d'odorant perçue).

Le test de go/no-go repose sur un conditionnement opérant de l'animal au cours d'un apprentissage associatif. Au fil de nombreuses sessions expérimentales, l'animal va apprendre par essai-erreur à adapter son comportement en fonction de l'odeur sentie. En général, deux odeurs sont présentées successivement dans un ordre aléatoire, l'une étant associée à une récompense (boisson sucrée la plupart du temps) et l'autre à une punition (boisson amère, choc électrique, ou tout simplement absence de récompense). Ainsi, une fois les animaux bien entraînés, il est possible de tester leurs capacités de discrimination entre les deux odeurs présentées. Ce test permet également de soumettre les animaux à des tâches de discriminations plus complexes, en présentant deux odeurs très similaires constituées de mélanges d'odorants dans des proportions différentes (Siopi et al. 2016). Le test de go/no-go peut être utilisé pour déterminer un seuil de détection odorante en présentant des concentrations décroissantes d'un odorant, toutes associées à une récompense, contre un fluide non-odorisé (eau distillée, huile minérale) et non récompensé (Martel et al. 2015). Dans notre situation expérimentale, le principal inconvénient de ce test est qu'il nécessite un apprentissage long, ce qui n'est pas compatible avec notre fenêtre de temps réduite pour étudier les individus au moment du sevrage.

L'aversion olfactive conditionnée est un test à conditionnement simple et rapide à induire. Il consiste à présenter à l'animal une boisson odorisée (sans en changer le goût) et à provoquer un malaise gastrique (par injection i.p. de chlorure de lithium généralement) juste après sa consommation. Ainsi, lors d'une nouvelle présentation de cette même boisson

odorisée, l'animal refusera totalement ou partiellement de la consommer. L'apprentissage est très rapide puisqu'une seule association odeur-malaise gastrique est suffisante pour induire une aversion robuste et durable dans le temps. Il est alors possible d'évaluer la consommation de boisson contenant des concentrations odorantes de plus en plus faibles pour déterminer le seuil de détection odorante (Aimé et al. 2007, 2014; Julliard et al. 2007; Tong et al. 2011). Cependant, avec des souris de 3 semaines, nous craignons que l'induction du malaise gastrique ne provoque un stress général trop important et une attitude de prostration chez les petits, faussant la mesure des capacités de détection odorante.

Une autre possibilité pour investiguer les capacités de détection olfactive consiste à mesurer le temps d'exploration des animaux en présence d'une source odorante. Le dispositif peut être simple : par exemple une planche à trou en plaçant la source odorante sous la planche (Mandairon et al. 2009). L'évaluation de la détection odorante se fait alors par comparaison du temps d'exploration de la source odorante par rapport à une source non odorante. Ainsi, ce test repose sur la curiosité naturelle des rongeurs à explorer des stimuli nouveaux. Néanmoins, la participation active de l'animal est nécessaire, dans un contexte où aucune tâche n'est explicitement requise. Chez des souris de 3 semaines, la volonté d'explorer ainsi de nouveaux stimuli nous semblait insuffisante et les niveaux d'anxiété trop importants pour mettre en place un test utilisant la planche à trou.

Nous avons finalement opté pour la technique de pléthysmographie, qui consiste à étudier le comportement de flairage induit par les odeurs. L'animal est placé dans une enceinte restreinte, n'est soumis à aucun conditionnement et n'a pas besoin d'exprimer un comportement particulier suite à la détection d'une odeur. On enregistre dans ce dispositif un paramètre intrinsèque à l'animal : sa respiration, et notamment son réflexe naturel de flairage pour l'échantillonnage olfactif d'un stimulus nouveau.

## 1. Protocole

### *a) Dispositif expérimental : la technique de pléthysmographie*

Le dispositif expérimental utilisé dans notre étude a été adapté des travaux de Hegoburu et collaborateurs (Hegoburu et al. 2011). Le pléthysmographe (Emka Technologies, France) était composé de deux compartiments : la chambre de l'animal et la chambre de référence (Figure 27). L'enceinte était constamment ventilée à hauteur de 2,2 L/min. Les parois de la

chambre de l'animal contenaient des ports, dont l'un était relié, grâce à un tube possédant une valve à 3 voies, à un flacon qui contenait une solution odorante ou de l'eau distillée. Ainsi, l'ouverture de la valve permettait de dévier le flux d'air et de faire entrer à l'intérieur de la chambre de l'animal de l'air qui était au contact de la solution contenue dans le flacon. Les variations de pression dues à la respiration de la souris ont été mesurées grâce à un capteur différentiel de pression, l'un des deux ports étant exposé à la chambre de l'animal et l'autre à la chambre de référence. Le signal respiratoire ainsi enregistré était amplifié, envoyé à une carte d'acquisition et affiché sur un ordinateur équipé du logiciel Axoscope (Axon Instruments, fréquence d'échantillonnage = 1 kHz).

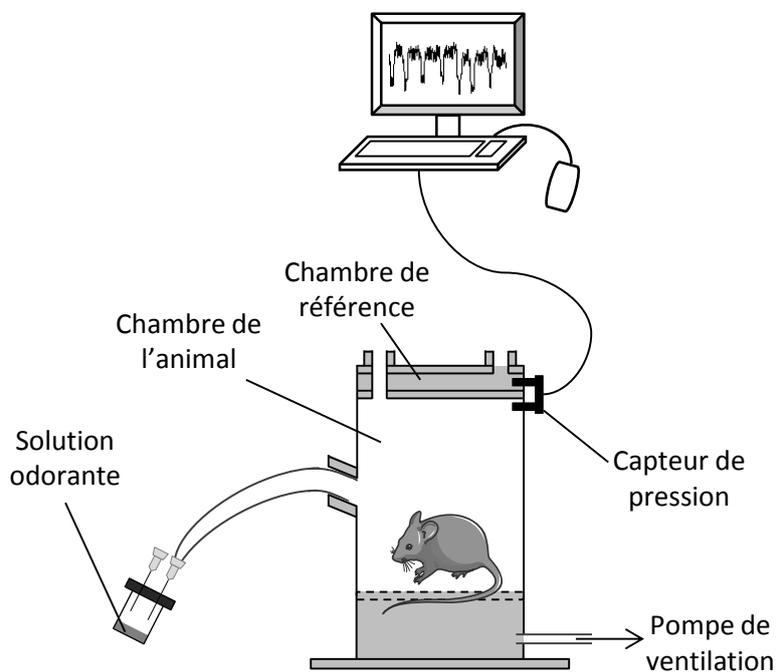


Figure 27 : Dispositif expérimental d'enregistrement de l'activité respiratoire des souris en réponse à des stimulations odorantes à l'aide d'un pléthysmographe

### *b) Déroulement du test*

Avant le test, une habitude au dispositif était nécessaire afin de réduire au maximum le stress et l'anxiété des souris au moment du test. Le jour précédant le test, les mâles ont été séparés de leur mère pendant une heure. Chaque mâle a ensuite été introduit dans le pléthysmographe et laissé en phase d'exploration sans dérangement pendant 10 min. Le flacon était rempli avec 1 mL d'eau distillée, et 6 à 10 stimulations ont été effectuées afin

d'accoutumer le souriceau au flux d'air entrant. Les stimulations (valve ouverte) duraient 30 sec et étaient espacées de périodes de repos (valve fermée) d'environ 1 min. Après la dernière stimulation, le souriceau était remis dans la cage de sa mère.

Le jour du test, les mâles ont été de nouveau séparés de leur mère pendant 1h avant de démarrer la procédure. Chaque souriceau était introduit dans le pléthysmographe et laissé 5 min sans dérangement avant de commencer les stimulations.

La respiration basale du souriceau était enregistrée pendant 30 sec avant chaque stimulation afin de comparer l'activité respiratoire lors d'une stimulation à une période de référence. Pour ce faire, l'expérimentateur observait le souriceau et attendait qu'il soit dans un état relativement calme, sans renifler activement, pour éviter que l'activité respiratoire de base ne soit biaisée par un comportement de flairage poussé dû à l'exploration de l'environnement. Une fois cet état de repos atteint pendant 30 sec consécutives, l'expérimentateur ouvrait la vanne pour réaliser la stimulation et la refermait 30 sec plus tard.

La séquence de stimulations comprenait d'abord une série de 3 stimulations minimum avec un flacon contenant de l'eau distillée, dans le but d'habituer la souris à la déviation du flux d'air entrant. Si après 6 stimulations la souris réagissait encore de manière apparente (flairage en direction du port, mise en mouvement), elle était sortie du pléthysmographe et repassée plus tard.

Pour les souris manifestant une bonne habitude à la déviation du flux d'air, le test se poursuivait et se terminait par 2 stimulations successives avec une solution odorante dans le flacon.

L'odeur choisie dans ce test était apportée par des solutions aqueuses de phényléthanol (PEA), qui possède une odeur de rose pour le nez humain. Plusieurs critères nous ont amenés à faire ce choix. Nous voulions d'abord une odeur qui n'avait *a priori* pas de connotation alimentaire, afin de se placer dans des conditions complètement différentes du test de nourriture enfouie. Nous voulions également une odeur simple, et choisir une molécule odorante unique nous permettait de contrôler précisément la concentration odorante au sein du flacon. Enfin, nous avons besoin d'une odeur qui induirait une modification notable de l'activité respiratoire lorsqu'elle serait perçue par les souriceaux. Lorsque les souris sont exposées à des odorants plaisants, attractifs, celles-ci passent plus de temps à investiguer la source odorante que lors d'une exposition à une odeur moins plaisante (Kobayakawa et al. 2007). Nous avons donc choisi le PEA, qui a été montré comme

étant très attractif chez la souris (Root et al. 2014), et défini la perception du PEA dans notre dispositif comme une augmentation d'activité respiratoire lors de la stimulation odorante par rapport à la période de base.

Les deux stimulations odorantes étaient donc effectuées avec une solution de PEA de concentration  $10^{-5}$  M, puis une solution à  $10^{-4}$  M. Ces concentrations ont été déterminées à partir d'expériences préliminaires sur d'autres cohortes de souris. Une même souris était ainsi exposée à l'odeur lors de deux présentations seulement, ce qui nous affranchit des phénomènes d'habituation rapportés dans la littérature (Wesson et al. 2008), du fait de l'absence de récompense associée à la présentation de l'odeur.

Les flacons contenant les solutions d'eau distillée ou de PEA étaient reliés au port du pléthysmographe par des tuyaux interchangeables, et un tuyau propre était remis en place avant chaque stimulation odorante, afin d'éviter une pollution odorante du tuyau par la stimulation précédente, ce qui modifierait les teneurs odorantes qui parviennent effectivement dans la chambre de l'animal.

De plus, l'intérieur de la chambre du pléthysmographe était nettoyé entre chaque animal pour enlever toute présence d'odeurs des congénères.

### *c) Traitement du signal et extraction des données*

Les enregistrements ont été analysés grâce à des routines écrites sous Matlab. Après une étape de filtrage du signal et d'élimination des artefacts électriques, les périodes de respiration basale et de stimulation odorante ont été délimitées et les cycles respiratoires ont été identifiés (Figure 28).

Le flairage des souris est un phénomène très dynamique, qui varie en fonction du contexte comportemental et qui peut être modulé par des événements olfactifs comme non olfactifs (bruit, mise en mouvement) (Wesson et al. 2008). L'analyse des enregistrements devait donc permettre de mettre en évidence les variations d'activité respiratoire en réponse à une détection odorante spécifiquement. Le fait d'habituer les souris au dispositif et au flux d'air entrant permettait de limiter au maximum les épisodes de flairage exploratoire.

L'analyse du signal était restreinte à la période de stimulation odorante et à la période de respiration basale immédiatement en amont. Sur chacune des périodes, deux paramètres respiratoires ont été mesurés :

- La fréquence respiratoire, qui correspond au nombre moyen de cycles respiratoires par unité de temps (exprimée en Hz).
- L'amplitude inspiratoire, qui correspond à la hauteur moyenne des pics d'inspiration (exprimée en unités arbitraires).

Ces deux paramètres ont été montrés comme étant très variables en fonction du comportement du rongeur. En particulier, la fréquence respiratoire est caractéristique du comportement exprimé, allant de  $2 \pm 0,4$  Hz lorsque l'animal dort à  $9,1 \pm 0,1$  Hz lors de l'exploration libre d'une source odorante chez le rat (Hegoburu et al. 2011). La fréquence respiratoire apparaît ainsi comme un indice fiable pour la détection d'un stimulus nouveau. Pour apporter plus de robustesse à notre analyse, nous avons également mesuré les amplitudes des inspirations, un autre paramètre modulé par la présentation d'une odeur chez le rongeur (Wesson et al. 2008; Youngentob 2005).

Avant de poursuivre l'analyse, deux critères d'exclusion ont été mis en place :

- Un individu était exclu de l'analyse si sa fréquence respiratoire moyenne en période basale était supérieure à 7,5 Hz lors de 2 stimulations ou plus, indiquant une activité de base et/ou un stress trop important. Ce critère est en accord avec les observations de Hegoburu et collaborateurs chez le rat, montrant qu'une fréquence respiratoire de 7,6 Hz était caractéristique d'un comportement exploratoire (Hegoburu et al. 2011), et avec les observations de Wesson et collaborateurs montrant une fréquence respiratoire de repos entre 5 et 7 Hz chez la souris (Wesson et al. 2008).
- Un individu était également exclu si la dernière stimulation à l'eau distillée induisait une augmentation de 10 % ou plus de la fréquence respiratoire et de l'amplitude inspiratoire par rapport à la respiration de base, révélant une modification du flairage en réponse à un événement non-olfactif et indiquant ainsi un échec dans l'habituation à la déviation du flux d'air entrant. Ce critère a été fixé empiriquement par comparaison des observations visuelles du comportement de l'animal avec les paramètres mesurés sur les enregistrements lors d'expérimentations préliminaires.

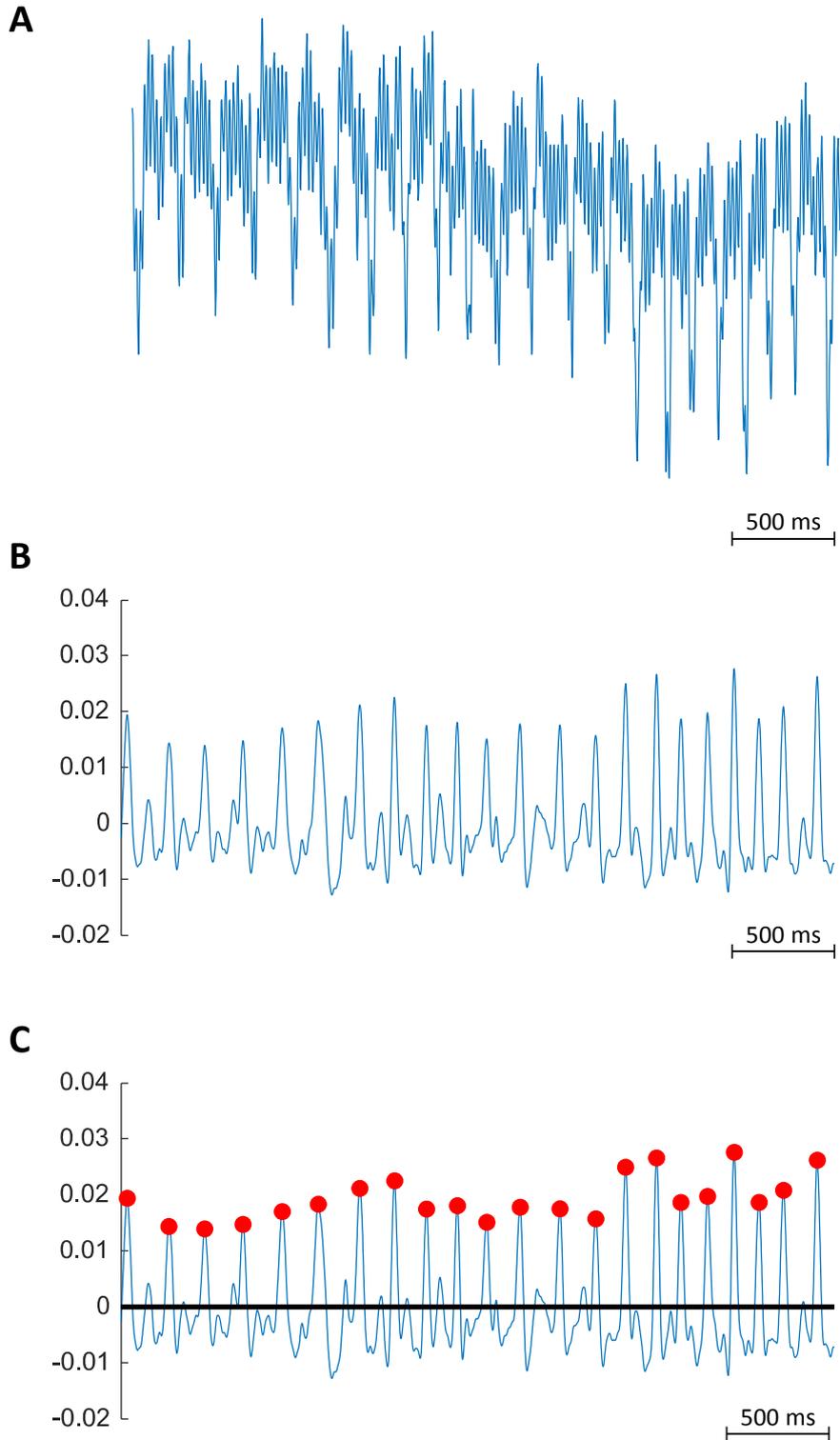


Figure 28 : Différentes étapes du traitement du signal enregistré dans le pléthysmographe

A. Signal brut, non traité. B. Signal filtré, orienté pour visualiser les inspirations vers le haut et les expirations vers le bas par rapport à une ligne de base d'ordonnée égale à 0. L'axe des ordonnées est gradué en unités arbitraires. C. Identification des cycles respiratoires. Les points rouges marquent les pics d'inspirations, et la distance entre deux points rouges correspond à la durée d'un cycle respiratoire.

Notons ici que notre analyse se fait sur des périodes de 30 sec et ne vise pas à détailler précisément les motifs de flairage au cours de l'échantillonnage olfactif. Lors d'une exploration odorante libre, la souris va en effet flairer de manière discontinue, sous forme d'épisodes brefs marqués par une fréquence respiratoire et une amplitude inspiratoire très élevées, non structurés et plus ou moins rapprochés dans le temps (Wesson et al. 2008). Notre objectif n'était pas de caractériser en détail les variations de fréquence ou d'amplitude au cours d'un échantillonnage olfactif, mais plutôt de révéler ou non une augmentation d'activité respiratoire en réponse à l'odeur. C'est pourquoi nous avons moyenné les deux paramètres sur les durées totales des périodes de stimulation odorante et de respiration basale. De manière similaire, l'étude de la fréquence respiratoire moyenne sur des périodes de 10 sec a déjà été utilisée, dans un dispositif de pléthysmographie corps entier, pour montrer une abolition du flairage d'une odeur alimentaire chez des rats après injection ICV d'insuline (Aimé et al. 2012).

Les deux paramètres ont ensuite été intégrés au sein d'un indice de flairage, calculé pour chaque période (respiration basale ou stimulation) de chaque enregistrement (stimulation à l'eau distillée ou odorante) et pour chaque animal.

La méthode utilisée pour établir l'indice de flairage est basée sur une normalisation par calcul de z-score, adaptée d'une utilisation en phénotypage comportemental (Guilloux et al. 2011).

Pour chacun des deux paramètres, la donnée brute était transformée en z-score par la formule :  $z = ((x-\mu)/\sigma)$  où  $x$  représente la donnée brute du paramètre mesuré,  $\mu$  et  $\sigma$  la moyenne et l'écart-type de la condition de référence, à savoir la période de respiration basale des souriceaux du groupe CTRL. Ensuite, la moyenne des deux z-score (« z-fréquence » et « z-amplitude ») était calculée pour établir l'indice de flairage (« z-sniffing »).

La mise en place d'un tel indice de flairage dans un dispositif de pléthysmographie a déjà été proposée par d'autres. Par exemple, Youngentob a défini un indice basé sur l'ensemble de 14 paramètres mesurés pendant une présentation odorante, incluant la fréquence respiratoire, l'amplitude des inspirations, la forme de la courbe inspiration-expiration, la durée des différentes étapes du cycle respiratoire (Youngentob 2005). Nous présentons ici un indice calculé à partir de seulement deux paramètres, mais qui semblent varier systématiquement lors d'une augmentation d'activité respiratoire induite par la perception d'une odeur nouvelle et attractive (Wesson et al. 2008).

## 2. Résultats et interprétation

Les résultats de comportement de flairage induit par l'odeur du PEA au sein des 3 groupes de souriceaux sont présentés en Figure 29.

Nous avons défini que le stimulus était perçu lorsque l'activité respiratoire augmentait pendant la stimulation par rapport à la respiration basale. Il fallait donc que les caractéristiques respiratoires en conditions basales soient les mêmes entre les 3 groupes de souriceaux. Pour chacune des stimulations, nous avons donc vérifié que l'indice de flairage pour la période de respiration basale n'était pas significativement différent entre les groupes (Figure 29, rectangles non pointillés, effet groupe :  $F(2,72) = 2,194$ ,  $p = 0,119$ ,  $F(2,72) = 0,00992$ ,  $p = 0,990$ ,  $F(2,72) = 2,193$ ,  $p = 0,119$ , pour la stimulation à l'eau distillée, au PEA à  $10^{-5}$  M et au PEA à  $10^{-4}$  M respectivement).

Nous avons également vérifié qu'une stimulation non odorante n'induisait pas d'augmentation de l'activité respiratoire, et ce dans aucun des 3 groupes (Figure 29.A, effet temps :  $F(1,72) = 0,0322$ ,  $p = 0,858$ ).

Lorsque le PEA était présenté à  $10^{-5}$  M, seuls les souriceaux du groupe CTRL ont augmenté leur flairage en réponse à la stimulation odorante (Figure 29.B, effet temps :  $F(1,72) = 16,69$ ,  $p < 0,001$  ; tests post-hoc période basale vs stimulation odorante : CTRL :  $t = 5,631$ ,  $p < 0,001$ , HFHS gest-lact :  $t = 0,4577$ ,  $p > 0,05$ , HFHS 8w + gest-lact :  $t = 2,086$ ,  $p > 0,05$ ). En revanche, les 3 groupes ont montré une augmentation de flairage suite à la présentation du PEA à  $10^{-4}$  M (Figure 29.C, effet temps :  $F(1,72) = 62,58$ ,  $p < 0,001$  ; tests post-hoc période basale vs stimulation odorante : CTRL :  $t = 6,267$ ,  $p < 0,001$ , HFHS gest-lact :  $t = 5,445$ ,  $p < 0,001$ , HFHS 8w + gest-lact :  $t = 2,789$ ,  $p < 0,05$ ).

De même que pour le test de nourriture enfouie, les données de comportement de flairage étaient très similaires entre les groupes HFHS gest-lact et HFHS 8w + gest-lact. Nous n'avons pas révélé d'effet additionnel du régime maternel pré-gestationnel par rapport au régime maternel pendant la gestation et la lactation sur l'activité de flairage des petits en réponse aux présentations de PEA.

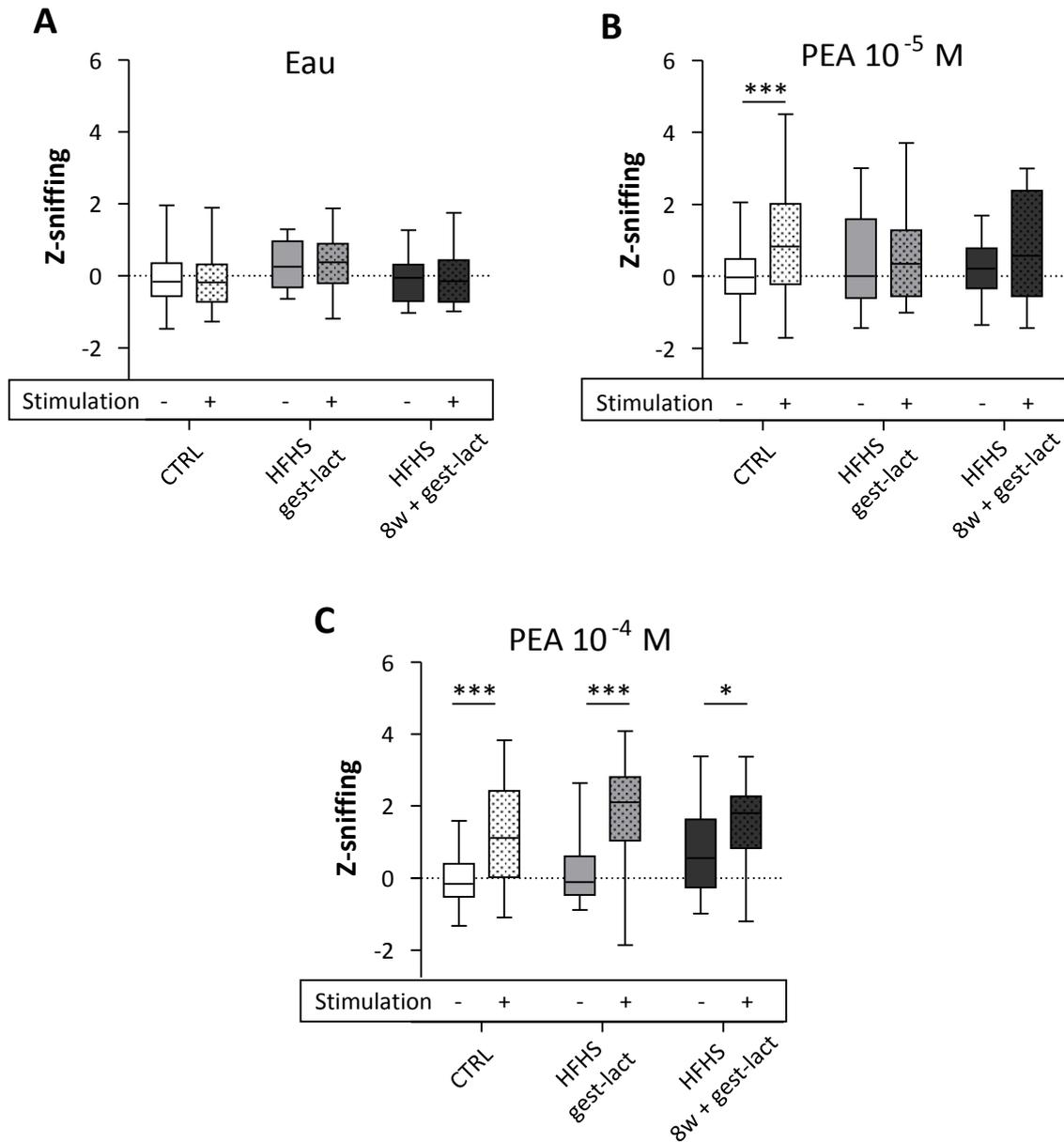


Figure 29 : Comportement de flairage induit par l'odeur du PEA dans un dispositif de pléthysmographie

Indices de flairage (« Z-sniffing ») calculés lors de la dernière stimulation à l'eau distillée (A), et des stimulations odorantes : PEA à  $10^{-5}$  M (B) puis PEA à PEA à  $10^{-4}$  M (C). L'encadré « stimulation » indique les périodes de respiration basale « - » et de stimulation « + ». CTRL : n=39, HFHS gest-lact : n=19, HFHS 8w + gest-lact : n=17. Les données sont représentées en boîtes à moustache : la barre horizontale représente la valeur médiane au sein du rectangle allant du 1<sup>er</sup> au 3<sup>ème</sup> quartile, et les segments mènent aux valeurs extrêmes. \* p < 0,05, \*\*\* p < 0,001 après une ANOVA à deux facteurs (groupe, temps : avant ou pendant la stimulation) sur mesures répétées suivie de comparaisons multiples de Bonferroni.

Ces données suggèrent donc une altération de la perception odorante induite par l'alimentation maternelle HFHS.

Un biais possible à cette interprétation serait que les individus HFHS ne réagissent pas à la stimulation odorante non pas car ils ne perçoivent pas l'odeur, mais parce qu'ils ne l'apprécient pas de la même manière que les individus CTRL. La valence du PEA viendrait alors fausser notre évaluation de sa détection par les souriceaux. L'influence de la valeur hédonique d'un stimulus olfactif sur les paramètres respiratoires reste peu explorée. On imagine aisément que la modulation de l'activité respiratoire sera différente en fonction du caractère plaisant ou déplaisant de l'odeur présentée. Le PEA serait plutôt catégorisée dans les odeurs plaisantes, ou tout du moins attractives pour les souris (Root et al. 2014) et les rats (Vaz et al. 2018). Mais au sein des odeurs attractives, le degré hédonique d'une odeur pourrait contribuer à l'intensité de l'augmentation du flairage.

Nous avons donc ré-analysé les données de flairage pour chaque individu afin de les classer en deux catégories : répondant ou non répondant, pour chaque stimulation. Ainsi, nous nous affranchissons de l'intensité de l'augmentation du flairage, les individus ayant répondu plus ou moins fort étant tous regroupés dans la catégorie « répondants ».

Pour cela, nous avons défini un seuil de réponse à partir des valeurs moyennes de z-sniffing pour les stimulations au PEA.

Nous avons remarqué que les augmentations de flairage significatives avec les tests statistiques employés (Figure 29.B CTRL, Figure 29.C CTRL, HFHS gest-lact et HFHS 8w + gest-lact) étaient caractérisées par une différence entre le z-sniffing moyen (à l'échelle du groupe d'individus) pour la période de stimulation et le z-sniffing moyen pour la période de base supérieure à 0,79. D'autre part, les différences de flairage non significatives avec les tests statistiques employés (Figure 29.B HFHS gest-lact et HFHS 8w + gest-lact) étaient caractérisées par une différence entre le z-sniffing moyen pour la période de stimulation et le z-sniffing moyen pour la période de base inférieure à 0,56.

Nous avons alors fixé le seuil de réponse individuelle à 0,7 : pour chaque individu, la différence de z-sniffing entre la stimulation et la période de base a été calculée, et l'individu a été classé comme répondant à la stimulation si cette différence était supérieure à 0,7. Nous avons ainsi calculé le nombre d'individus ayant répondu à au moins une stimulation odorante (Tableau 4).

	<b>CTRL</b>	<b>HFHS gest-lact</b>	<b>HFHS 8w + gest-lact</b>
<b>Nb individus au total</b>	39	19	17
<b>Nb de répondants à au moins une stimulation</b>	30	16	14
(% d'individus totaux)	(77 %)	(84 %)	(82 %)

Tableau 4 : Pourcentage d'individus répondants dans les trois groupes

La proportion d'individus répondants à au moins une stimulation était similaire dans les 3 groupes ( $\chi_{(2)}^2 = 0,5$ ,  $p > 0,05$ ). Ainsi, la même proportion d'individus manifestant une réponse pour le PEA était observée dans les 3 groupes. Les 3 groupes de souriceaux semblent donc apprécier de manière semblable le PEA.

En utilisant le comportement de flairage comme mesure de la performance olfactive, nous avons donc montré que les souriceaux provenant de mères soumises à une alimentation HFHS présentaient une perception altérée du PEA dans un contexte exploratoire libre. Notre protocole utilisant le pléthysmographe et notre méthode d'analyse de l'activité respiratoire semblent appropriés pour apprécier les capacités olfactives de jeunes souris.

En conclusion de cette partie, qui visait à étudier l'impact de l'alimentation maternelle HFHS sur le comportement olfactif de la progéniture, nous avons mis en évidence une perturbation des capacités olfactives des petits provenant de mères nourries au régime HFHS. Avec les deux approches expérimentales employées, nous avons montré une altération de la perception odorante chez les petits des mères exposées à l'aliment HFHS, envers une odeur alimentaire dans un contexte de recherche de nourriture d'une part, et envers une odeur *a priori* non alimentaire dans un contexte comportemental sans tâche requise d'autre part.

L'alimentation maternelle HFHS pendant la gestation et la lactation impacte fortement le comportement olfactif de la progéniture à l'âge de 3 semaines. En revanche, l'alimentation maternelle HFHS avant la gestation ne semble pas exacerber cet impact.

D'où provient cette altération du comportement olfactif chez les petits des groupes HFHS ? Pour répondre à cette question, nous avons d'abord investigué le fonctionnement du système olfactif périphérique (objectif 3) avant de nous pencher sur quelques aspects du traitement olfactif au sein du système olfactif central (objectif 4).

# Objectif 3 : Etude du fonctionnement de la muqueuse olfactive

---

Le fonctionnement du système olfactif a été décrit dans la deuxième partie des données bibliographiques de ce manuscrit. La perception d'une odeur repose sur la détection des molécules odorantes par la MO et par l'intégration du message au sein du BO et des structures centrales olfactives. Une perception olfactive altérée peut alors provenir de dysfonctionnements à différents niveaux du traitement du signal odorant. La première étape pouvant être affectée est l'étape de détection des molécules odorantes par les OSNs de la MO.

Pour qu'une molécule odorante soit détectée par la MO, elle doit d'abord interagir avec un récepteur et activer une cascade de transduction olfactive.

Nous avons quantifié l'expression des principaux éléments de la cascade AMPc-dépendante au sein de la MO dans les 3 groupes de souriceaux, afin de déterminer si un défaut d'expression dans la cascade de transduction pouvait être à l'origine de la perception olfactive altérée chez les petits des groupes HFHS. Nous nous sommes également penchés sur l'expression des récepteurs à l'insuline et à la leptine au sein de la MO pour mettre en évidence un éventuel effet sur la modulation métabolique de la MO, avant de tester *ex vivo* la sensibilité aux odorants de cette MO.

## I. Expression génique au sein de la muqueuse olfactive

Nous avons quantifié les ARN messagers (ARNm) codant pour les principaux éléments de la cascade de transduction olfactive AMPc-dépendante : Golf, ACIII, CNGA2 et PDE au sein de la MO. Nous avons également mesuré les taux d'ARNm codant pour les récepteurs à l'insuline (Ins-R) et à la leptine (Lept-R), car les OSNs et les cellules de soutien de la MO expriment de nombreux récepteurs aux hormones métaboliques ([Palouzier-Paulignan et al. 2012](#)).

L'expression génique a été mesurée par RT-qPCR. Cette technique permet d'amplifier une région d'intérêt du génome et ainsi de mesurer la quantité initiale d'ARNm au sein d'un tissu.

## 1. Protocole

### a) *Prélèvement du tissu*

Les souriceaux ont été étourdis à l'isoflurane puis sacrifiés par décapitation. Le museau a ensuite été disséqué afin de prélever l'EO recouvrant la cloison septale et le revers dorsal (Figure 30).

Les tissus ont été congelés dans l'azote liquide immédiatement après prélèvement puis stockés à -80 °C en attendant l'extraction des ARNm.

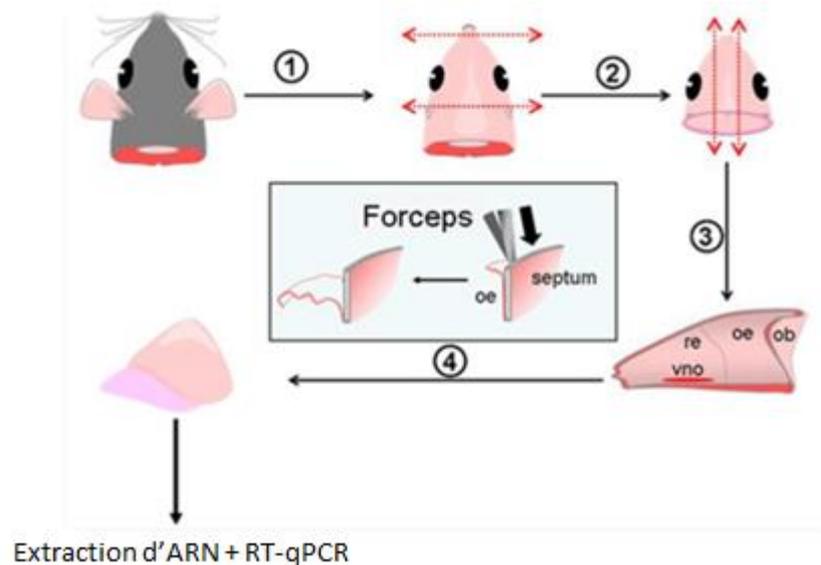


Figure 30 : Représentation schématique des étapes de dissection du museau de souris pour prélever l'épithélium olfactif

vno : organe voméronasal, re : épithélium respiratoire, oe : épithélium olfactif, ob : bulbe olfactif. D'après Aoudé 2012.

### b) *Extraction des ARNm et transcription inverse*

Les tissus ont été lysés (Tissue Lyser™, 2 x 2 min à 25 Hz) puis l'extraction des ARNs totaux a ensuite été réalisée sur colonne grâce à un kit commercial (Nucleospin RNA plus kit, Macherey-Nagel).

La concentration en ARNs a été mesurée à l'aide de puces Expérian (Biorad), qui permettent également de vérifier l'intégrité des ARNs (RQI > 7).

Les ADNc ont été synthétisés par transcription inverse à partir de 1 µg d'ARN (PrimeScript™ RT reagent Kit, Takara) et stockés à -20 °C avant utilisation.

*c) Amplification des régions d'intérêt par qPCR*

La PCR quantitative a été réalisée sur 1 µL (50 ng) d'ADNc, auxquels a été ajouté un mélange réactionnel contenant du SYBR Green (SYBR Green Master Mix, Life Technologies), ainsi que les amorces spécifiques de nos régions d'intérêt (250 nM). Le design des amorces et le test de leur efficacité en PCR ont été réalisés en amont de nos expérimentations par l'ingénieure de notre équipe (Tableau 5).

	<b>Sens</b>	<b>Anti-sens</b>
<i>Gapdh</i>	CCTGGAGAAACCTGCCAAGTAT	CTGTTGAAGTCGCAGGAGACAA
<i>Golfa</i>	CTTGGCAGGGAAGTCAAAAATC	GGCTGGTGCTGATCCTCAAGAA
<i>ACIII</i>	AGGCGACTGTTACTACTGCATCTG	ACGTACGAGATGGCCTCTACCA
<i>CNGA2</i>	GGCACCAAAAAGAAATTTGAACTG	CAGGCTCTGGCTACCACCAGA
<i>PDE1C</i>	GCAGCAGAACGGTGACTTGA	TCCGGTGTGGAGTGATCCT
<i>Ins-R</i>	TGCTCATGCCCTAAGACTGACT	CCACGTTGTGCAGGTAATCC
<i>Lept-R</i>	TGGCTTAGAATTCCTGCAATGT	GCTTGTCGATAGCATCTTTGGT

Tableau 5 : Séquences nucléotidiques des amorces utilisées en qPCR

La qPCR a été lancée dans un thermocycleur StepOne (ThermoFisher Scientific, Applied Biosystems), pendant 40 cycles d'amplification comprenant chacun 3 sec à 95°C et 30 sec à 60°C.

Les résultats d'amplification obtenus étaient exprimés en Ct et la quantification de l'expression des ARNm a été calculée comme étant la différence de Ct entre le gène d'intérêt et le gène de référence pour chaque individu. Le gène de référence sélectionné était *Gapdh*, codant pour la glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (enzyme ubiquitaire intervenant dans la glycolyse). Ce gène de référence s'est révélé être le plus stable dans nos conditions expérimentales.

## 2. Résultats et interprétation

Cette étude en biologie moléculaire n'a pas révélé de différence dans l'expression génique des 4 éléments de la cascade de transduction olfactive au sein de la MO des souriceaux des 3 groupes expérimentaux (Figure 31.A.1, Golf :  $K = 2,415$ ,  $p = 0,299$  ; figure 31.A.2, ACIII :  $K = 0,613$ ,  $p = 0,736$  ; figure 31.A.3, CNG :  $K = 0,571$ ,  $p = 0,752$  ; figure 31.A.4, PDE :  $K = 1,318$ ,  $p = 0,517$ ). Ces 4 éléments sont donc présents et exprimés de la même manière chez tous les souriceaux. L'alimentation maternelle HFHS n'a pas modifié les taux d'ARNm des éléments principaux de la cascade de transduction olfactive dans la MO de la progéniture.

Dans nos 3 groupes de souris, l'expression d'Ins-R était également similaire (Figure 31.B.1,  $K = 1,112$ ,  $p = 0,573$ ). En revanche, le Lept-R était moins exprimé de 8,1% dans le groupe HFHS 8w + gest-lact par rapport au groupe CTRL (Figure 31.B.2,  $K = 9,825$ ,  $p = 0,0074$ ).

Comme les taux de leptine étaient plus élevés dans le groupe HFHS 8w + gest-lact que dans le groupe CTRL, cette baisse d'expression du Lept-R pourrait provenir d'un mécanisme compensatoire de type régulation négative (*down-regulation*), comme c'est le cas pour les RCPG (Sarret 2000).

Néanmoins, si les ARNm sont exprimés de la même manière, cela ne signifie pas forcément que les protéines le sont : un effet de l'alimentation maternelle HFHS sur la traduction des ARNm en protéines ou au niveau des modifications post-traductionnelles n'est pas exclu, ce qui affecterait les taux d'expression protéiques.

Plutôt que d'évaluer l'expression protéique de ces éléments par des techniques de biologie moléculaire (western blot) ou par immunohistochimie, nous avons choisi de tester directement la fonctionnalité de la MO par des enregistrements *ex vivo* de son activité électrique en réponse à une stimulation odorante. La sensibilité de la MO a ainsi été mesurée par EOG.

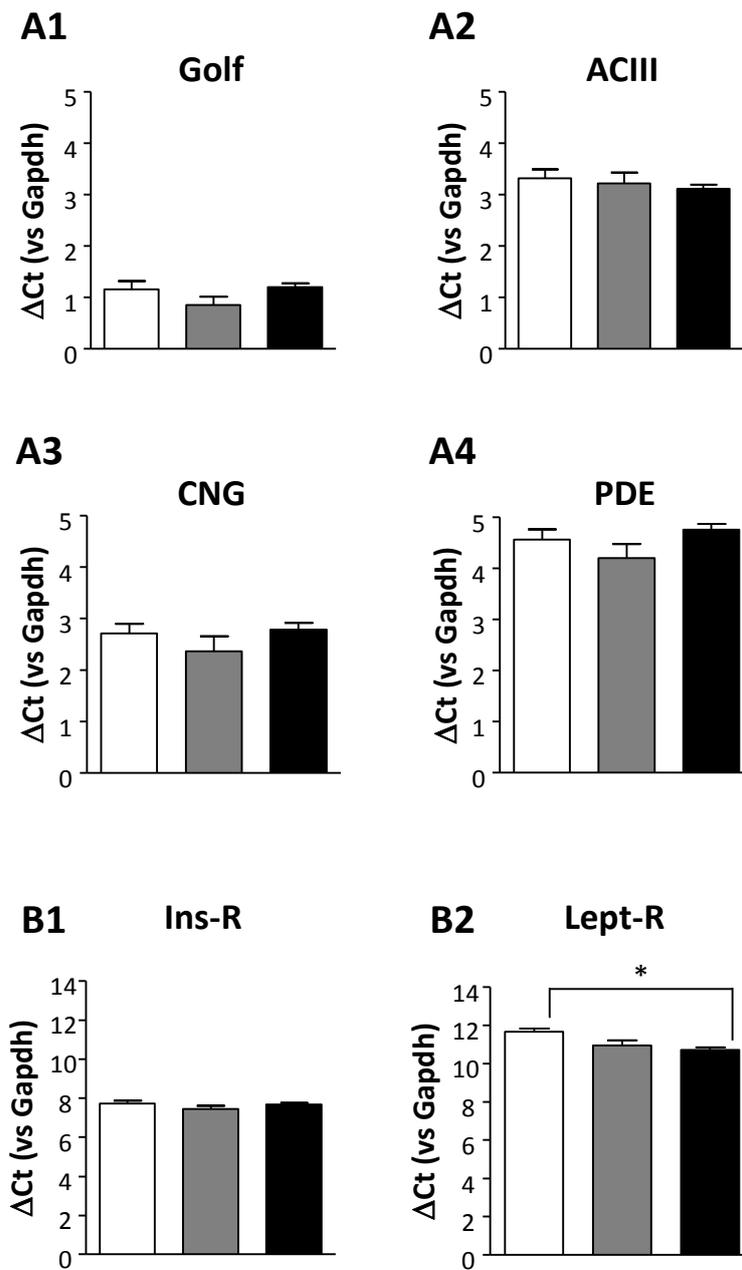


Figure 31 : Expression génique au sein de la MO des souriceaux des 3 groupes

Les ARNm codant pour les principaux éléments de la cascade de transduction olfactive AMPc-dépendante (A) et pour les récepteurs à deux hormones métaboliques (B) ont été quantifiés par RT-qPCR. A.1. Sous unité alpha de la protéine G spécifique des neurones olfactifs (Golf). A.2. Adénylate cyclase III (ACIII). A.3. Canal de type A2 activable par les nucléotides cycliques (CNG). A.4. Phosphodiesterase (PDE). B.1. Récepteur à l'insuline (Ins-R). B.2. Récepteur à la leptine (Lept-R). CTRL : n=11, HFHS gest-lact : n=6, HFHS 8w + gest-lact : n=6. Les données sont représentées en moyennes  $\pm$  sem. \* p < 0,05 après un test de Kruskal-Wallis suivis de comparaisons multiples de Dunn.

## II. Sensibilité de la muqueuse olfactive

Pour tester la fonctionnalité de la cascade de transduction AMPc-dépendante, nous avons mesuré *ex vivo* la réponse d'un ensemble d'OSNs à une stimulation odorante. La technique d'EOG permet de mesurer le potentiel de champ produit à la surface de la MO par la sommation des courants récepteurs émis par une population d'OSNs, en réponse à une stimulation odorante.

### 1. Protocole

#### *a) Dispositif expérimental : le poste d'enregistrement EOG*

Le dispositif d'enregistrement EOG a été adapté des travaux de Lacroix et collaborateurs (Lacroix et al. 2008) (Figure 32). Le poste comprenait une chambre placée sous une loupe binoculaire, qui servait à positionner l'hémi-tête. Un flux constant d'air humidifié ( $\sim 1\text{L}/\text{min}$ ) était délivré à 2 cm du tissu via un tube en téflon de 7 mm de diamètre. Ce tube comprenait un orifice latéral permettant d'y insérer une pipette Pasteur en verre, contenant un papier filtre imbibé de solution odorante (10  $\mu\text{L}$ ). Les stimulations odorantes étaient réalisées en propulsant de l'air (200 ms à 1 psi) à l'intérieur de la pipette Pasteur.

Une électrode composée d'un fil d'argent préalablement chloruré à l'aide d'une solution de chlorure ferrique puis recouvert d'une fine pellicule de gel conducteur (Signa Gel, Parker Laboratory) était positionnée sur le BO et servait d'électrode de référence. L'électrode d'enregistrement était également constituée d'un fil d'argent chloruré, enfilé dans une micropipette de verre de 8  $\mu\text{m}$  de diamètre (pour l'extrémité en contact avec la MO) remplie avec une solution saline, composée de : 45 mM de KCl, 20 mM de  $\text{KC}_2\text{H}_3\text{O}_2$ , 55 mM de  $\text{NaCH}_3\text{SO}_4$ , 1 mM de  $\text{MgSO}_4$ , 5 mM de  $\text{CaCl}_2$ , 10 mM d'HEPES, 11 mM de glucose, 50 mM de mannitol. Le pH de cette solution était ajusté à 7,4 et l'osmolarité à 350 mOsm par ajout de mannitol. Le signal électrique était enregistré à l'aide d'un amplificateur (Axoclamp 200B, Axon Instruments) en configuration « current-clamp  $I = 0$  ». Le signal analogique était ensuite converti en signal numérique avec une fréquence d'échantillonnage de 1 kHz grâce à un convertisseur (Digidata 1440, Axon Instruments), puis filtré (filtre passe bas à 300Hz), numérisé et enregistré sur un ordinateur équipé du logiciel Axoscope (Axon Instruments, Molecular Devices).

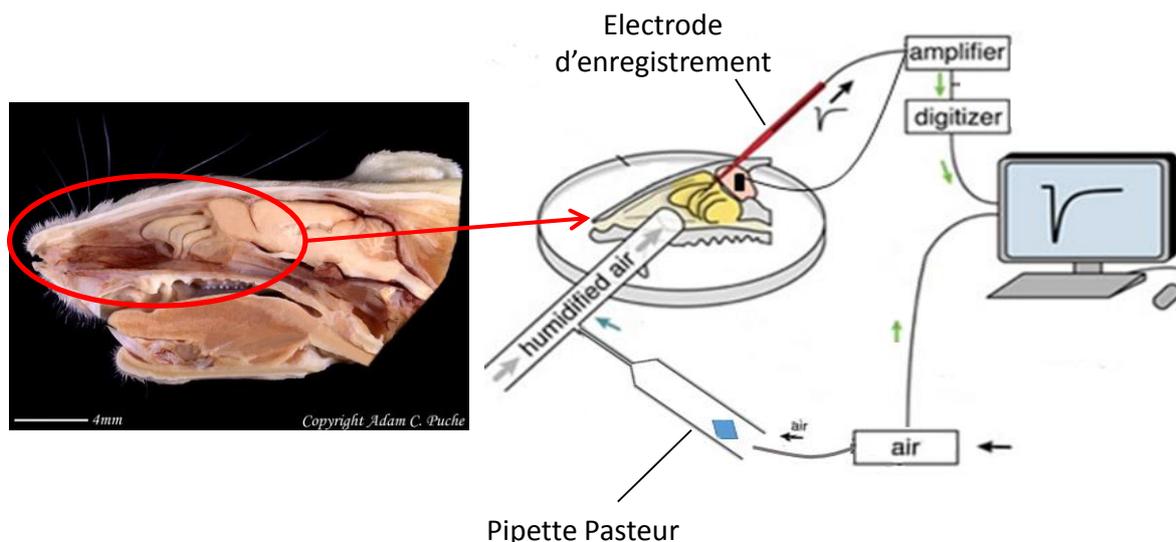


Figure 32 : Dispositif expérimental permettant d'enregistrer par EOG la réponse de la MO à des stimulations odorantes

A gauche : photo d'une hémis-tête de rat, montrant l'emplacement des cornets olfactifs. A droite : dispositif expérimental. L'électrode d'enregistrement est positionnée sur la surface de l'épithélium olfactif recouvrant les cornets et reliée au poste d'enregistrement. La pipette Pasteur chargée d'un papier filtre imbibé (en bleu) est placée dans l'ouverture du tuyau apportant le flux d'air continu sur les tissus et reliée à un système de propulsion d'air. D'après Cygnar et al. 2010.

*b) Déroulement de la procédure*

Les solutions odorantes de PEA et d'acétophénone (ACE, Sigma) (Figure 33) étaient préparées avant chaque manipulation. Les odorants purs étaient dilués dans du diméthylsulfoxyde (DMSO, Sigma) pour préparer une solution concentrée à 0,5 M, à partir de laquelle ont été préparées des solutions à  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$  et  $10^{-6}$  M par dilutions en cascade dans de l'eau distillée.



Figure 33 : Structure chimique des odorants utilisés en EOG

A gauche : le PEA à odeur de rose pour le nez humain, à droite l'ACE qui évoque l'amande.

Les souriceaux ont été étourdis à l'isoflurane puis sacrifiés par décapitation. La tête a été disséquée pour enlever la peau, la partie inférieure de la mâchoire et l'arrière de la tête. Une section au niveau de la cloison septale a permis d'obtenir deux hémis-têtes dévoilant les cornets olfactifs de chaque côté. L'hémi-tête non immédiatement utilisée était placée dans une coupelle avec un morceau de papier absorbant imbibé d'eau distillée et gardée au réfrigérateur, afin de préserver le tissu dans une atmosphère humide le temps d'effectuer les enregistrements sur l'autre hémi-tête. Cette dernière était disséquée plus en détails sous une loupe binoculaire afin de dévoiler l'épithélium olfactif recouvrant les cornets puis placée dans la chambre d'enregistrement. Le flux d'air et les électrodes étaient ensuite positionnés, et les pipettes Pasteur chargées avec les papiers filtres imbibés.

Une première série d'enregistrements a été effectuée en positionnant l'électrode d'enregistrement au niveau du cornet III.

La première stimulation était réalisée avec un papier filtre imbibé d'eau distillée, afin d'enregistrer la réponse mécanique de la MO suite à une stimulation non odorante. La MO était ensuite stimulée avec les solutions de concentrations croissantes de PEA ou d'ACE. Les stimulations étaient séparées d'un temps de repos d'1 min. Une fois les 7 stimulations réalisées, l'hémi-tête était jetée et la même procédure était effectuée sur l'autre hémi-tête avec le deuxième odorant.

Entre deux individus, les papiers filtres imbibés de solutions odorantes étaient changés.

Lors d'une seconde série, l'électrode d'enregistrement était placée sur l'organe septal. L'OS était facilement identifiable sous lumière UV chez nos souris exprimant la GFP sous contrôle du promoteur de *sr1*, présent dans environ 50 % de la population d'OSNs de l'OS.

La dissection était légèrement différente : au lieu de sectionner la tête au niveau de la cloison septale pour obtenir deux hémis-têtes, les cavités nasales étaient ouvertes en faisant deux incisions latérales, de chaque côté de la cloison septale et parallèlement à celle-ci. L'épithélium septal ainsi dégagé était laissé attaché à la cloison septale et l'OS était visualisé sous lumière UV. Le tout était ensuite déposé dans la chambre d'enregistrement, l'un des OS étant découvert et l'autre étant masqué. Une première série de stimulations odorantes était réalisée de la même manière que précédemment, puis le bloc était retourné pour réaliser les stimulations sur le deuxième OS avec l'autre odorant.

Nous avons ainsi obtenu des signaux EOG enregistrés sur 2 zones distinctes de l'EO (EO principal et OS) en réponse à 2 gammes de solutions odorantes (PEA et ACE).

c) *Traitement du signal EOG et extraction des données*

Les enregistrements ont été analysés grâce à des routines écrites sous Matlab. Après filtrage du signal et élimination des artéfacts électriques, l'algorithme détermine plusieurs caractéristiques (Figure 34).

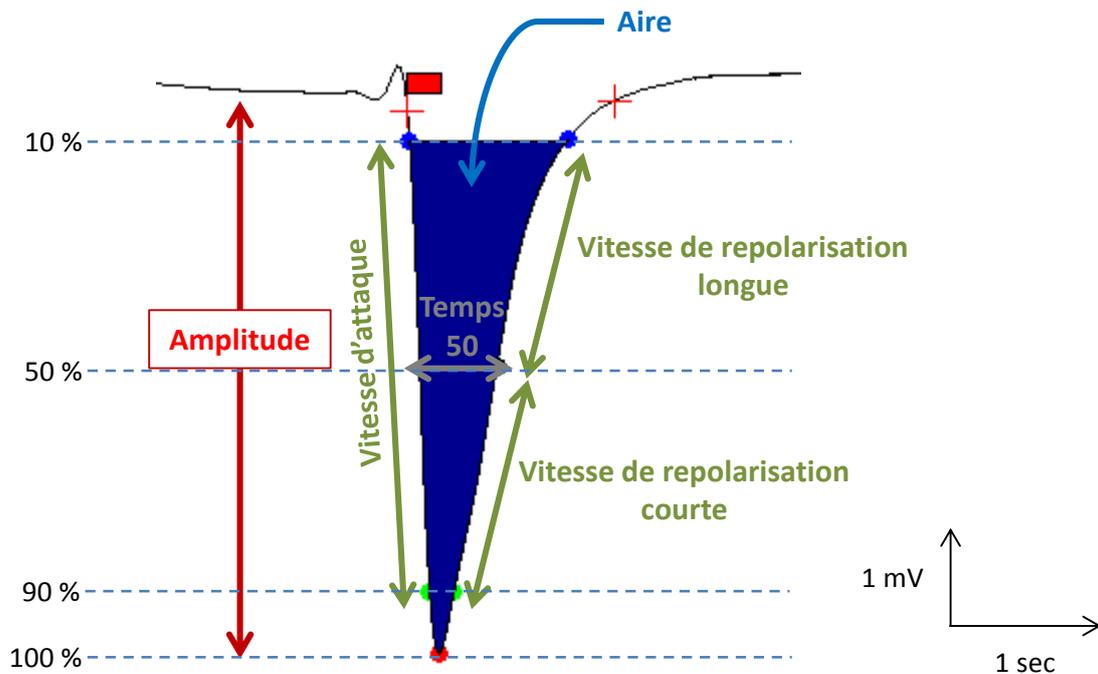


Figure 34 : Caractéristiques mesurées sur les signaux EOG

Le rectangle rouge au-dessus de la courbe de dépolarisation marque la stimulation odorante, les deux croix rouges délimitent la dépolarisation de la MO caractérisée par son amplitude, son aire, le temps passé à plus de 50 % de l'amplitude, la vitesse d'attaque et les temps de repolarisation.

Les caractéristiques du signal EOG permettent d'évaluer plusieurs aspects de la réponse odorante :

- L'amplitude du signal dépend du nombre de neurones activés par l'odeur et de leur degré de réponse individuelle.
- La vitesse d'attaque (pente du signal pour passer de 10 % à 90 % de l'amplitude) dépend également du nombre d'OSNs et de leur latence de réponse.
- Les vitesses de repolarisation (courte : pente du signal pour revenir de 90 % à 50 % de l'amplitude, et longue : pente du signal pour revenir de 50 % à 10 %) reflètent la terminaison du signal au sein des OSNs dont la cascade de transduction olfactive a

été activée par l'odeur, et dépend aussi des mécanismes d'élimination et de dégradation des odorants au sein des OSNs et dans le mucus.

- Le temps passé à plus de 50 % de l'amplitude du signal marque la durée de réponse des OSNs.
- L'aire englobe tous ces paramètres et représente la dépolarisation totale, ou l'intensité globale d'activation de l'EO.

La caractéristique la plus souvent retenue pour présenter des résultats EOG est l'amplitude du signal en fonction de la concentration odorante, sous forme de courbes dose-réponse.

Empiriquement, l'amplitude du signal suit une courbe sigmoïde en fonction du logarithme de la concentration en odorant. Le modèle le plus approprié pour la plupart des odorants est l'équation de Hill :  $A = A_{\max} / (1 + 10^{-k(C - EC_{50})})$ , où A est l'amplitude,  $A_{\max}$  l'amplitude maximale pour les concentrations saturantes, k le coefficient de Hill, C la concentration odorante et  $EC_{50}$  la concentration pour laquelle 50 % de  $A_{\max}$  est atteinte.

Les données brutes obtenues pour l'amplitude du signal ont donc été approximées selon ce modèle (Figure 35). L'amplitude du blanc (réponse mécanique suite à la 1<sup>ère</sup> stimulation à l'eau distillée) était soustraite à la valeur de l'amplitude pour chaque concentration odorante. La qualité de l'approximation a systématiquement été vérifiée grâce au coefficient de corrélation ( $R^2$ ), et la série de données était écartée de l'analyse si le  $R^2$  était inférieur à  $(MOY - 2 * ET)$ , où MOY représente la moyenne des  $R^2$  pour les courbes d'un même odorant sur une même zone, et ET l'écart-type.

Pour comparer les courbes entre les différents groupes de souriceaux, nous avons testé les différences statistiques entre les 3 paramètres qui décrivent les courbes :  $EC_{50}$ , k et  $A_{\max}$ .

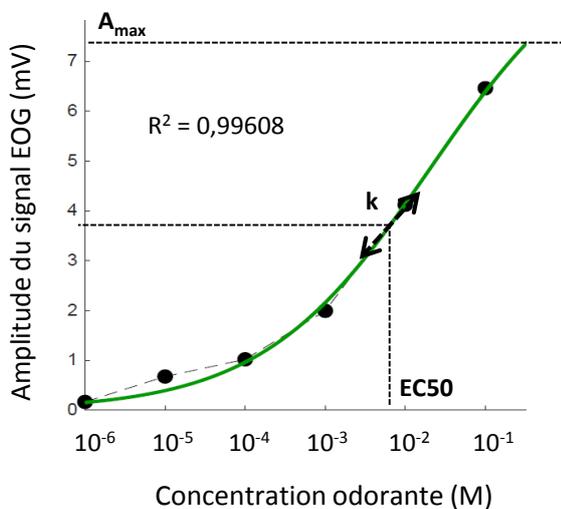


Figure 35 : Analyse de l'amplitude du signal EOG en fonction de la concentration odorante

Les données brutes (points noirs) sont approximées par une courbe qui suit l'équation de Hill (en vert). Les 3 paramètres qui décrivent la courbe ( $EC_{50}$ , k et  $A_{\max}$ ) sont représentés ainsi que la qualité de l'approximation ( $R^2$ ).

Pour les autres caractéristiques du signal EOG, seuls les résultats bruts obtenus pour une stimulation odorante à une concentration proche de l'EC50 sont présentés.

Les résultats d'EOG n'ont pas été comparés entre les 3 groupes de souriceaux (CTRL, HFHS gest-lact et HFHS 8w + gest-lact), mais entre les 4 groupes présentés en [Figure 16](#). Les souriceaux provenant de mères n'ayant jamais été exposées au régime HFHS n'ont pas été regroupés en un même groupe CTRL dans cette expérience car les manipulations n'ont pas été réalisées au même moment. Or, nous nous sommes rendu compte que les données récoltées en EOG pouvaient être très variables en fonction de la période de l'année et des conditions environnementales (température, humidité). Nous avons donc décidé de comparer chaque groupe HFHS à son propre groupe standard dont les manipulations ont été effectuées au même moment. Dans cette partie traitant des résultats EOG uniquement, nous séparons l'interprétation des données en fonction du design expérimental. Le design expérimental 1 compare le groupe HFHS gest-lact au groupe standard 1) de la figure 17 (qui sera noté « SD 1 ») et le design expérimental 2 compare le groupe HFHS 8w + gest-lact au groupe standard 3) de la figure 17 (qui sera noté « SD 3 »). L'analyse statistique des résultats a été réalisée avec des tests t de Student sur données non appariées lorsque les données suivaient une distribution normale et avec des tests de Mann-Whitney sinon.

## 2. Résultats et interprétation

Les figures 36 à 43 représentent les résultats obtenus pour les stimulations avec le PEA et ACE, en enregistrant la réponse de la MO sur le cornet III et sur l'OS, pour les deux designs expérimentaux.

a) Enregistrements sur l'EO principal

➤ Stimulations odorantes : PEA

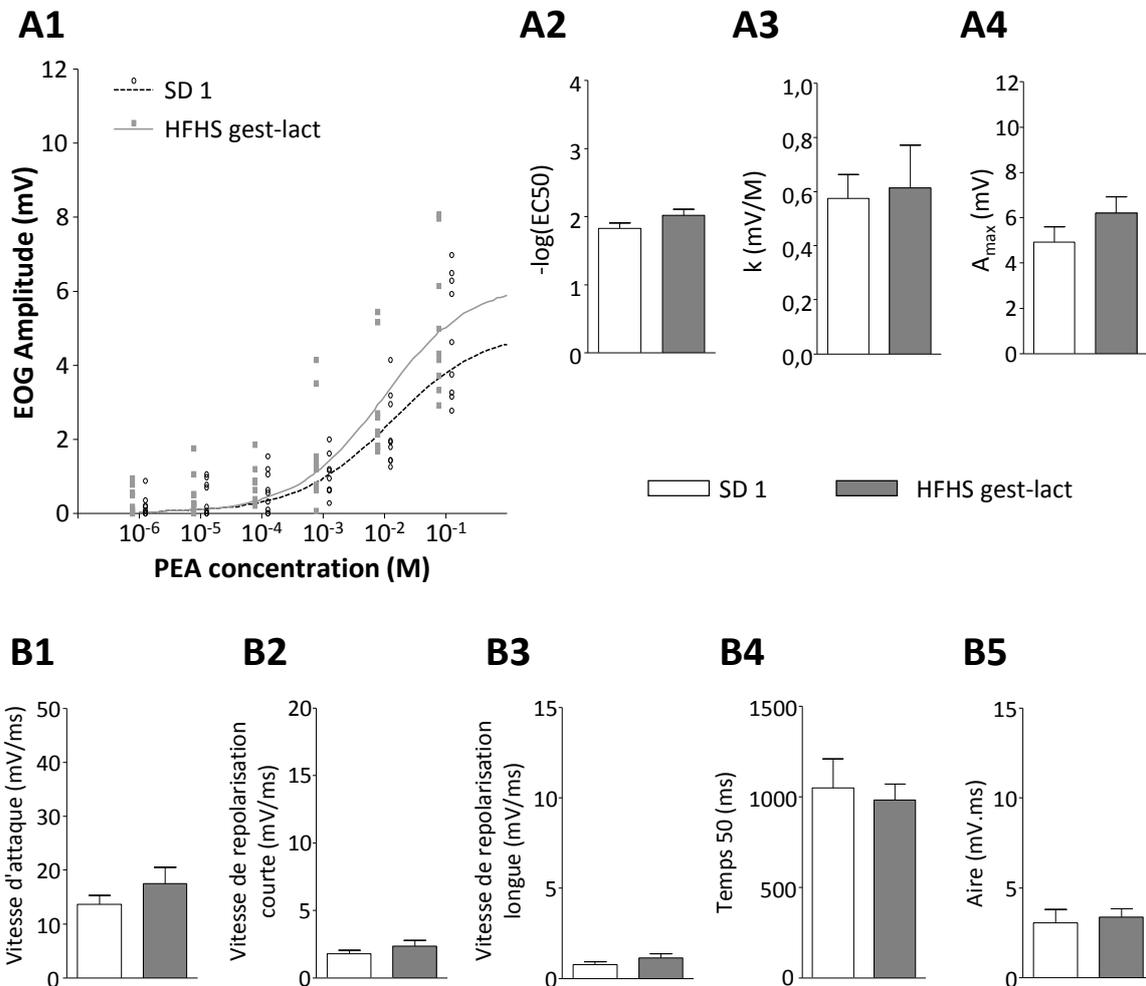


Figure 36 : Données obtenues en EOG pour des stimulations du cornet III avec des concentrations croissantes de PEA – Groupe HFHS gest-lact vs SD 1

Les courbes doses-réponses (A.1) représentent l'amplitude du signal EOG en fonction de la concentration en PEA utilisée pour la stimulation odorante. Chaque symbole correspond à une donnée individuelle brute. Pour chacun des groupes la courbe moyenne des approximations individuelles par l'équation de Hill est représentée. En A.2, A.3 et A.4 figurent les paramètres moyens des approximations de Hill pour les courbes doses-réponses de l'amplitude en fonction de la concentration ( $-\log(\text{EC}_{50})$ ,  $k$  et  $A_{\text{max}}$ ). Les autres caractéristiques du signal EOG ont été calculées pour la stimulation odorante à  $10^{-2}$  M (B.1 : vitesse d'attaque, B.2 : vitesse de repolarisation courte, B.3 : vitesse de repolarisation longue, B.4 : temps passé à plus de 50% de l'amplitude, B.5 : aire totale). SD 1 :  $n=9$ , HFHS gest-lact :  $n=9$ . Tous les histogrammes représentent les moyennes  $\pm$  sem.

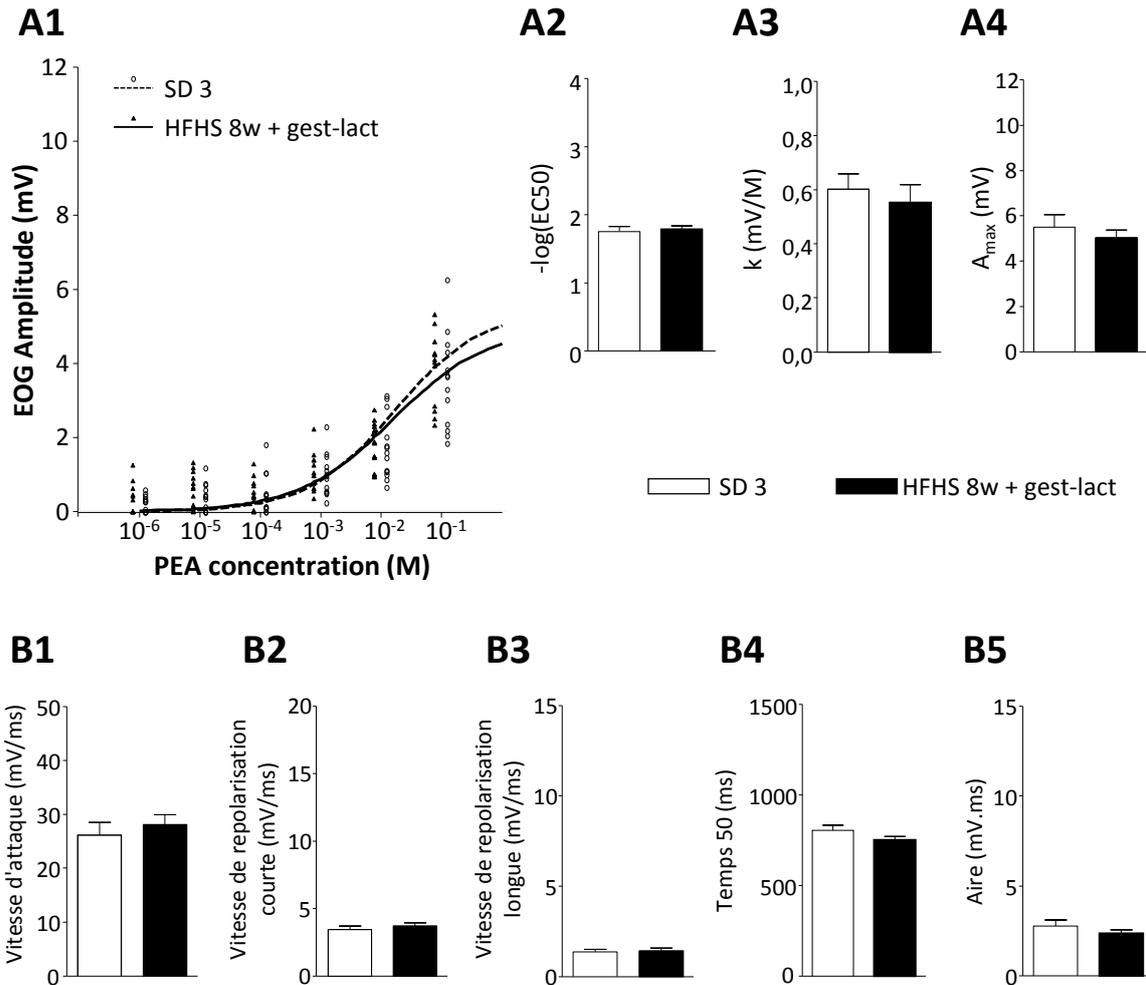


Figure 37 : Données obtenues en EOG pour des stimulations du cornet III avec des concentrations croissantes de PEA – Groupe HFHS 8w + gest-lact vs SD 3

Les courbes doses-réponses (A.1) représentent l'amplitude du signal EOG en fonction de la concentration en PEA utilisée pour la stimulation odorante. Chaque symbole correspond à une donnée individuelle brute. Pour chacun des groupes la courbe moyenne des approximations individuelles par l'équation de Hill est représentée. En A.2, A.3 et A.4 figurent les paramètres moyens des approximations de Hill pour les courbes doses-réponses de l'amplitude en fonction de la concentration ( $-\log(\text{EC}_{50})$ ,  $k$  et  $A_{\text{max}}$ ). Les autres caractéristiques du signal EOG ont été calculées pour la stimulation odorante à  $10^{-2}$  M (B.1 : vitesse d'attaque, B.2 : vitesse de repolarisation courte, B.3 : vitesse de repolarisation longue, B.4 : temps passé à plus de 50% de l'amplitude, B.5 : aire totale). SD 3 :  $n=13$ , HFHS 8w + gest-lact :  $n=13$ . Tous les histogrammes représentent les moyennes  $\pm$  sem.

➤ Stimulations odorantes : ACE

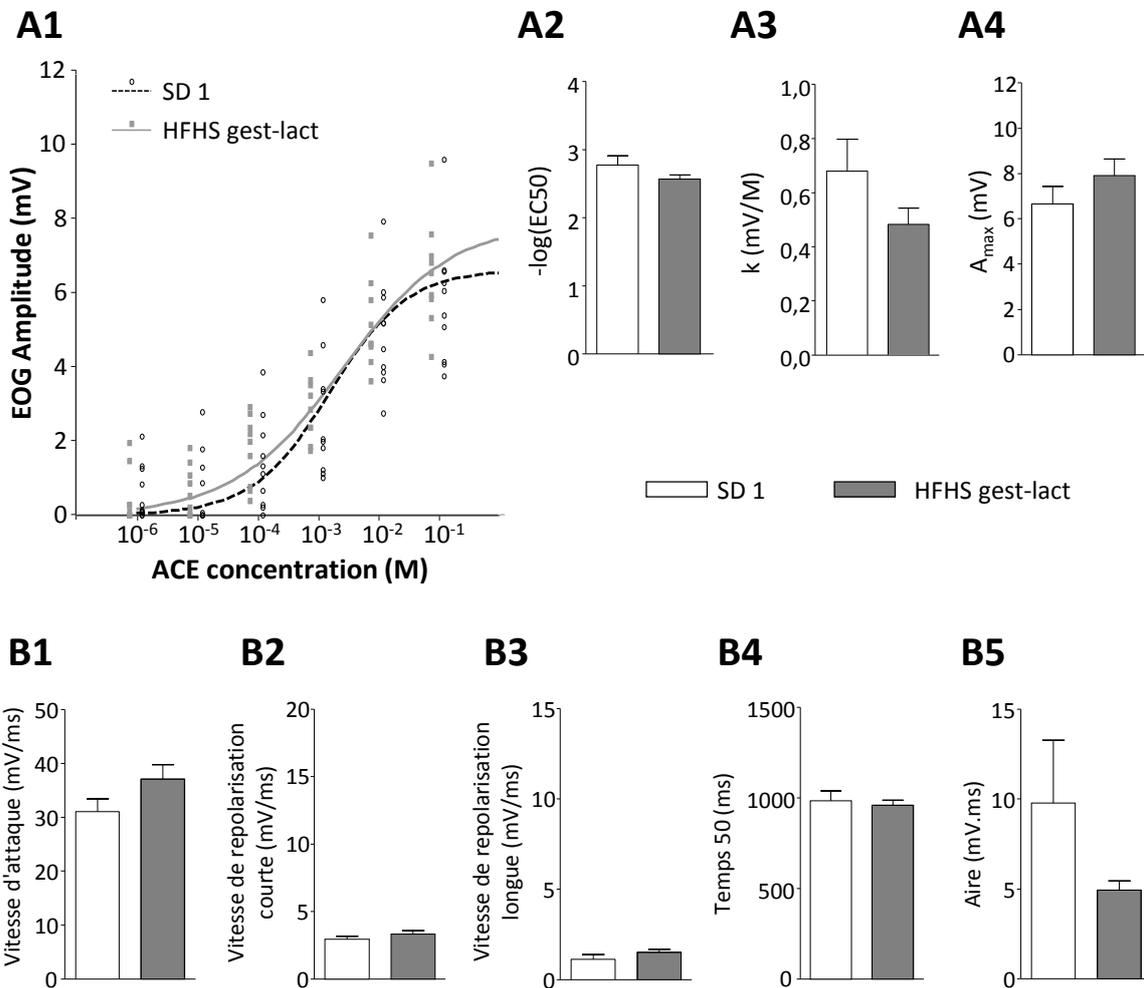


Figure 38 : Données obtenues en EOG pour des stimulations du cornet III avec des concentrations croissantes de ACE – Groupe HFHS gest-lact vs SD 1

Les courbes doses-réponses (A.1) représentent l'amplitude du signal EOG en fonction de la concentration en ACE utilisée pour la stimulation odorante. Chaque symbole correspond à une donnée individuelle brute. Pour chacun des groupes la courbe moyenne des approximations individuelles par l'équation de Hill est représentée. En A.2, A.3 et A.4 figurent les paramètres moyens des approximations de Hill pour les courbes doses-réponses de l'amplitude en fonction de la concentration ( $-\log(\text{EC}_{50})$ ,  $k$  et  $A_{\text{max}}$ ). Les autres caractéristiques du signal EOG ont été calculées pour la stimulation odorante à  $10^{-3}$  M (B.1 : vitesse d'attaque, B.2 : vitesse de repolarisation courte, B.3 : vitesse de repolarisation longue, B.4 : temps passé à plus de 50% de l'amplitude, B.5 : aire totale). SD 1 :  $n=10$ , HFHS gest-lact :  $n=9$ . Tous les histogrammes représentent les moyennes  $\pm$  sem.

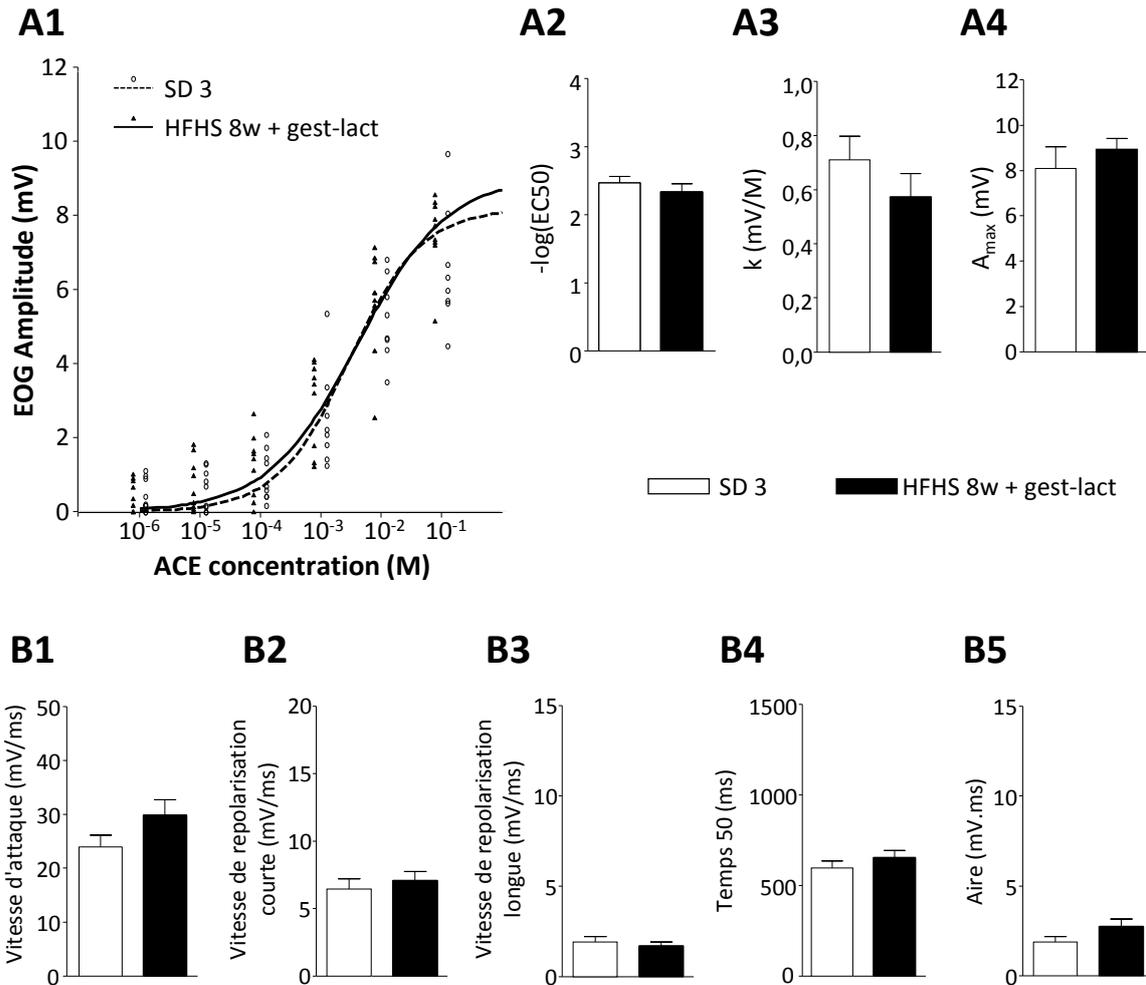


Figure 39 : Données obtenues en EOG pour des stimulations du cornet III avec des concentrations croissantes de ACE – Groupe HFHS 8w + gest-lact vs SD 3

Les courbes doses-réponses (A.1) représentent l'amplitude du signal EOG en fonction de la concentration en ACE utilisée pour la stimulation odorante. Chaque symbole correspond à une donnée individuelle brute. Pour chacun des groupes la courbe moyenne des approximations individuelles par l'équation de Hill est représentée. En A.2, A.3 et A.4 figurent les paramètres moyens des approximations de Hill pour les courbes doses-réponses de l'amplitude en fonction de la concentration ( $-\log(\text{EC}_{50})$ ,  $k$  et  $A_{\text{max}}$ ). Les autres caractéristiques du signal EOG ont été calculées pour la stimulation odorante à  $10^{-3}$  M (B.1 : vitesse d'attaque, B.2 : vitesse de repolarisation courte, B.3 : vitesse de repolarisation longue, B.4 : temps passé à plus de 50% de l'amplitude, B.5 : aire totale). SD 3 :  $n=9$ , HFHS 8w + gest-lact :  $n=9$ . Tous les histogrammes représentent les moyennes  $\pm$  sem.

b) Enregistrements sur l'OS

➤ Stimulations odorantes : PEA

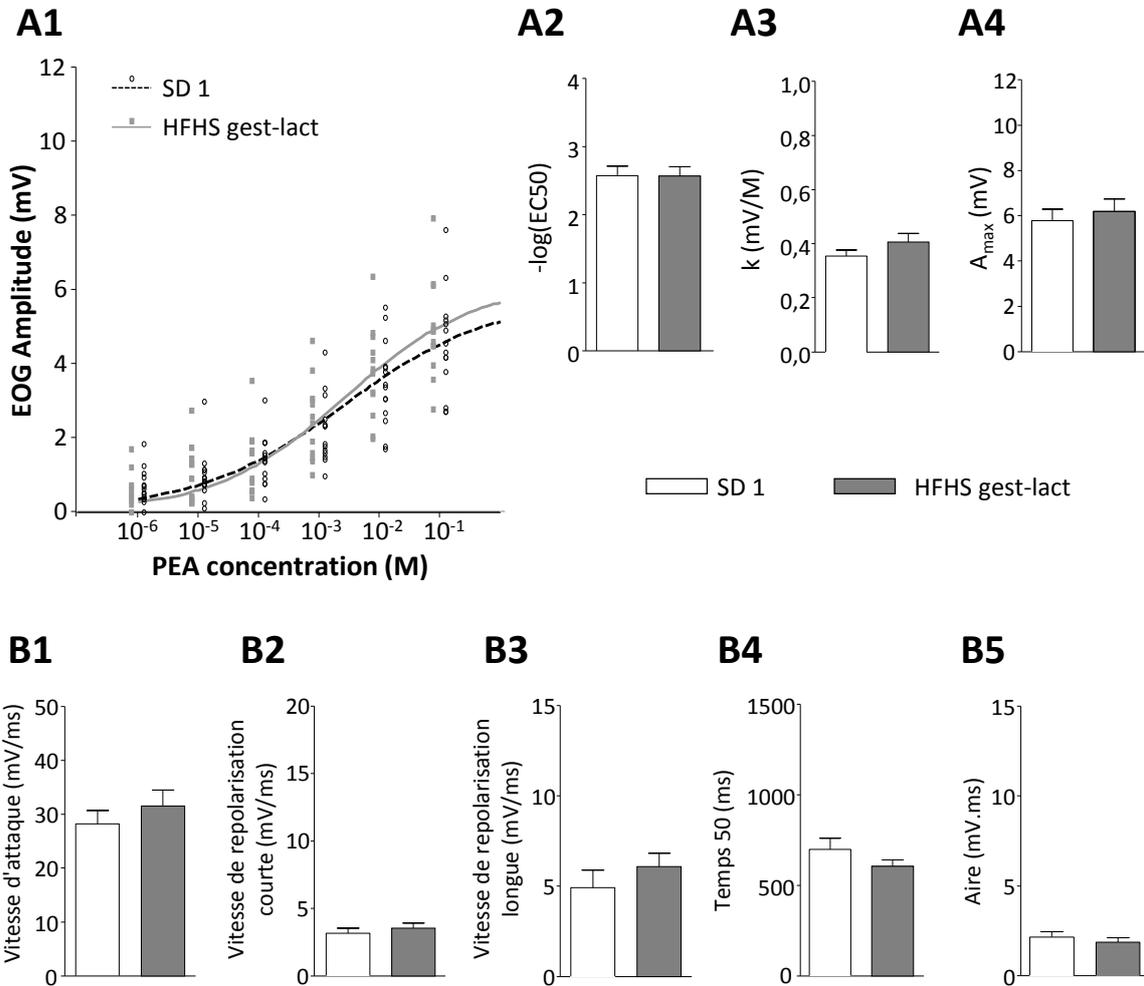


Figure 40 : Données obtenues en EOG pour des stimulations de l'organe septal avec des concentrations croissantes de PEA – Groupe HFHS gest-lact vs SD 1

Les courbes doses-réponses (A.1) représentent l'amplitude du signal EOG en fonction de la concentration en PEA utilisée pour la stimulation odorante. Chaque symbole correspond à une donnée individuelle brute. Pour chacun des groupes la courbe moyenne des approximations individuelles par l'équation de Hill est représentée. En A.2, A.3 et A.4 figurent les paramètres moyens des approximations de Hill pour les courbes doses-réponses de l'amplitude en fonction de la concentration ( $-\log(\text{EC}_{50})$ ,  $k$  et  $A_{\max}$ ). Les autres caractéristiques du signal EOG ont été calculées pour la stimulation odorante à  $10^{-3}$  M (B.1 : vitesse d'attaque, B.2 : vitesse de repolarisation courte, B.3 : vitesse de repolarisation longue, B.4 : temps passé à plus de 50% de l'amplitude, B.5 : aire totale). SD 1 : n=14, HFHS gest-lact : n=12. Tous les histogrammes représentent les moyennes  $\pm$  sem.

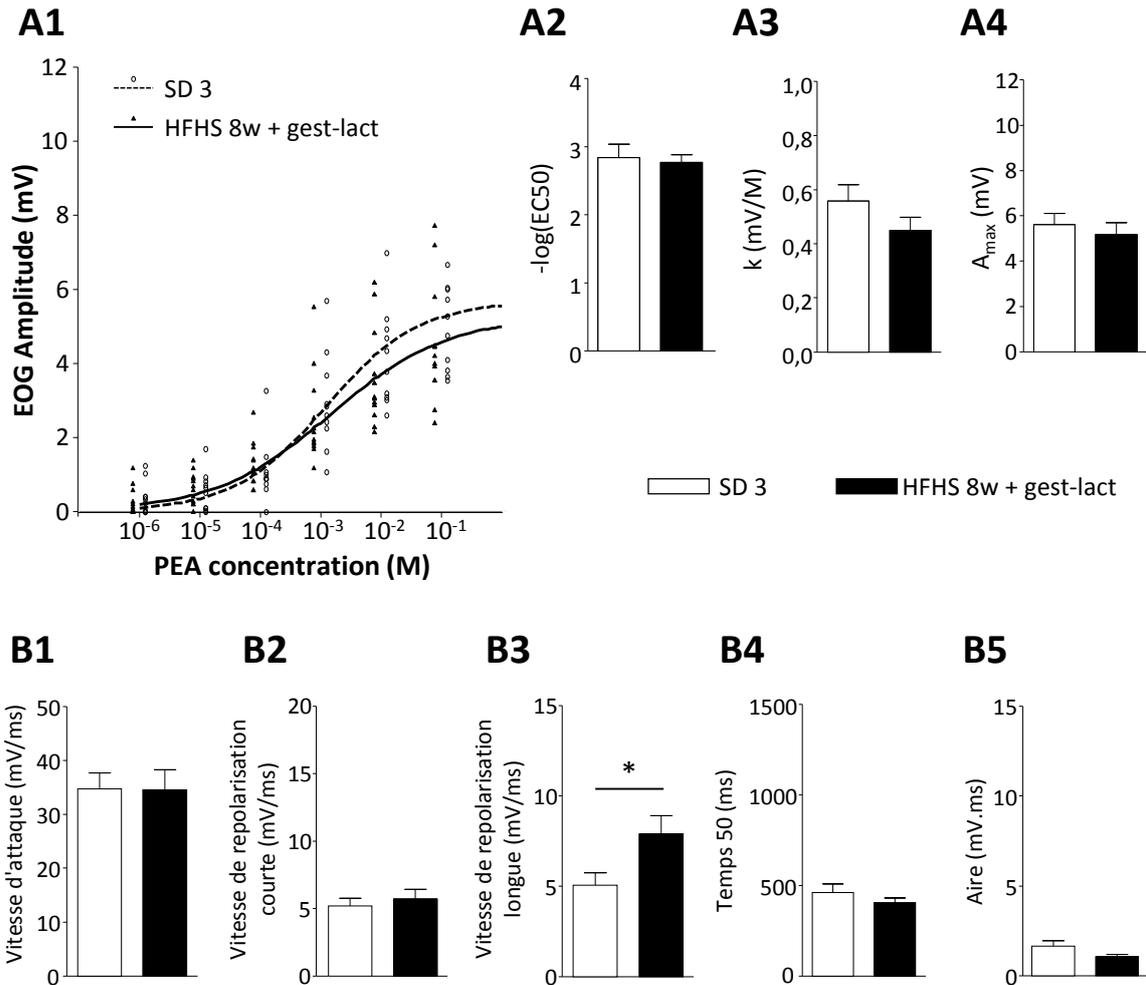


Figure 41 : Données obtenues en EOG pour des stimulations de l'organe septal avec des concentrations croissantes de PEA – Groupe HFHS 8w + gest-lact vs SD 3

Les courbes doses-réponses (A.1) représentent l'amplitude du signal EOG en fonction de la concentration en PEA utilisée pour la stimulation odorante. Chaque symbole correspond à une donnée individuelle brute. Pour chacun des groupes la courbe moyenne des approximations individuelles par l'équation de Hill est représentée. En A.2, A.3 et A.4 figurent les paramètres moyens des approximations de Hill pour les courbes doses-réponses de l'amplitude en fonction de la concentration ( $-\log(\text{EC}_{50})$ ,  $k$  et  $A_{\text{max}}$ ). Les autres caractéristiques du signal EOG ont été calculées pour la stimulation odorante à  $10^{-3}$  M (B.1 : vitesse d'attaque, B.2 : vitesse de repolarisation courte, B.3 : vitesse de repolarisation longue, B.4 : temps passé à plus de 50% de l'amplitude, B.5 : aire totale). SD 3 :  $n=10$ , HFHS 8w + gest-lact :  $n=12$ . Tous les histogrammes représentent les moyennes  $\pm$  sem. \*  $p < 0,05$  après un test t de Student.

➤ Stimulations odorantes : ACE

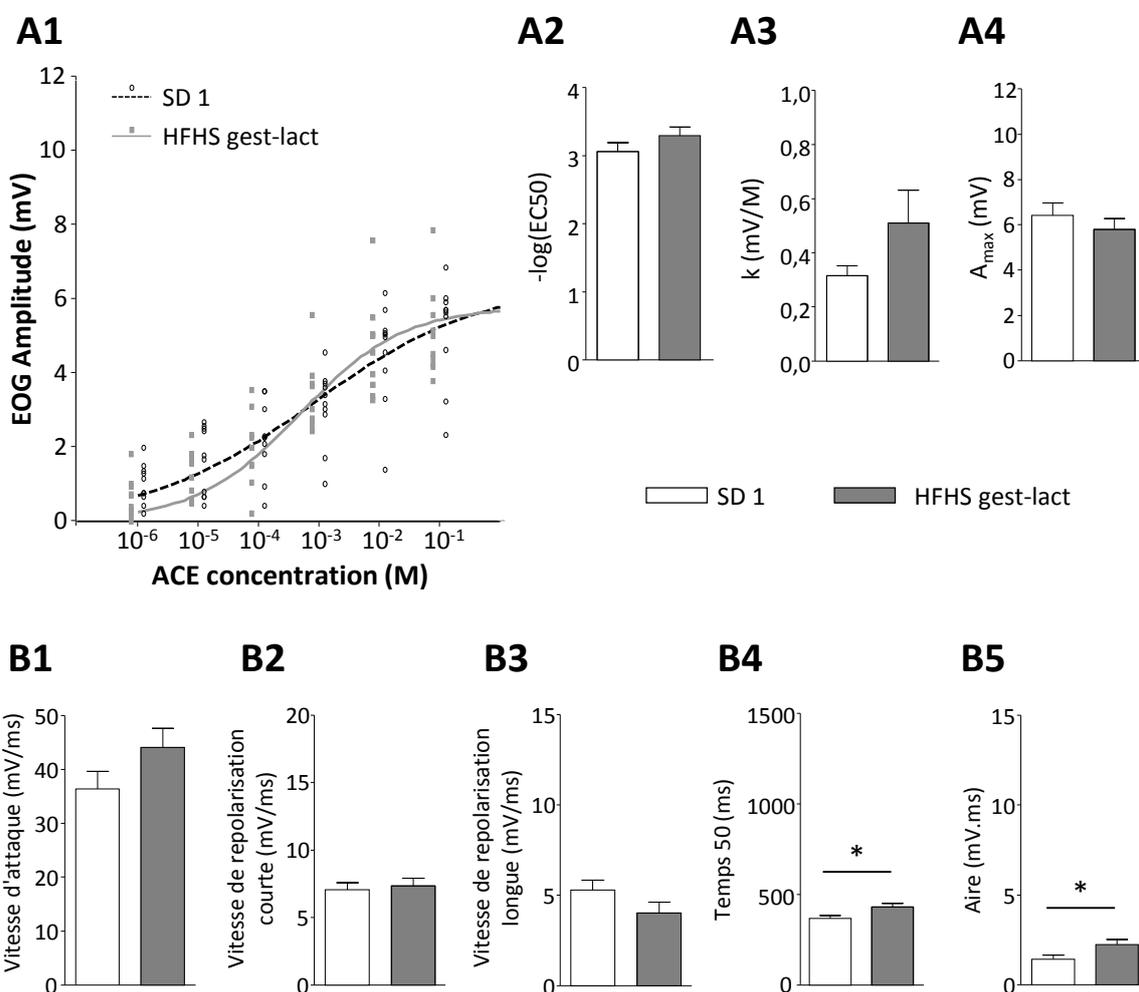


Figure 42 : Données obtenues en EOG pour des stimulations de l'organe septal avec des concentrations croissantes de ACE – Groupe HFHS gest-lact vs SD 1

Les courbes doses-réponses (A.1) représentent l'amplitude du signal EOG en fonction de la concentration en ACE utilisée pour la stimulation odorante. Chaque symbole correspond à une donnée individuelle brute. Pour chacun des groupes la courbe moyenne des approximations individuelles par l'équation de Hill est représentée. En A.2, A.3 et A.4 figurent les paramètres moyens des approximations de Hill pour les courbes doses-réponses de l'amplitude en fonction de la concentration ( $-\log(\text{EC}_{50})$ ,  $k$  et  $A_{\text{max}}$ ). Les autres caractéristiques du signal EOG ont été calculées pour la stimulation odorante à  $10^{-3}$  M (B.1 : vitesse d'attaque, B.2 : vitesse de repolarisation courte, B.3 : vitesse de repolarisation longue, B.4 : temps passé à plus de 50% de l'amplitude, B.5 : aire totale). SD 1 :  $n=10$ , HFHS gest-lact :  $n=10$ . Tous les histogrammes représentent les moyennes  $\pm$  sem. \*  $p < 0,05$  après un test de Mann-Whitney (B.4) ou un test t de Student (B.5).

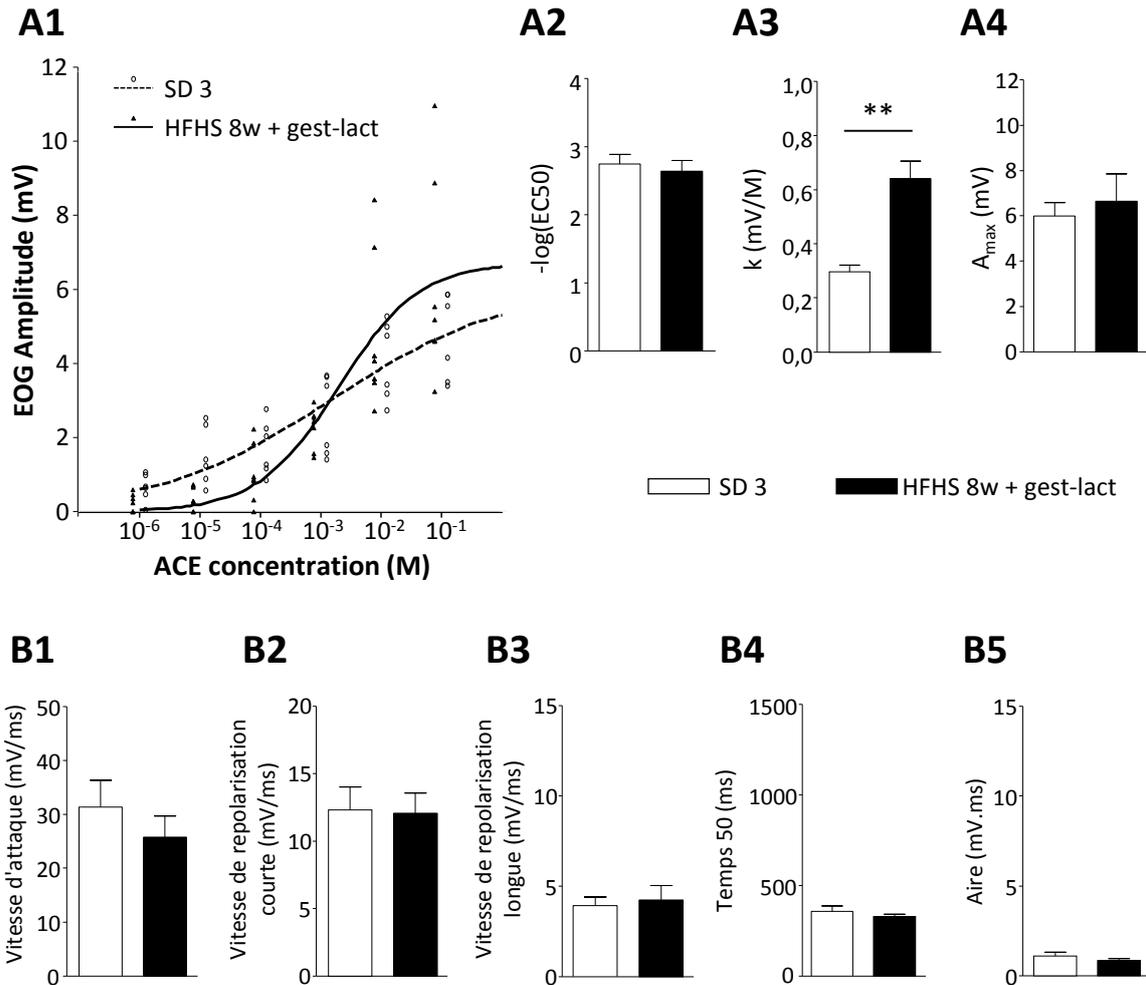


Figure 43 : Données obtenues en EOG pour des stimulations de l'organe septal avec des concentrations croissantes de ACE – Groupe HFHS 8w + gest-lact vs SD 3

Les courbes doses-réponses (A.1) représentent l'amplitude du signal EOG en fonction de la concentration en ACE utilisée pour la stimulation odorante. Chaque symbole correspond à une donnée individuelle brute. Pour chacun des groupes la courbe moyenne des approximations individuelles par l'équation de Hill est représentée. En A.2, A.3 et A.4 figurent les paramètres moyens des approximations de Hill pour les courbes doses-réponses de l'amplitude en fonction de la concentration ( $-\log(\text{EC}_{50})$ ,  $k$  et  $A_{\text{max}}$ ). Les autres caractéristiques du signal EOG ont été calculées pour la stimulation odorante à  $10^{-3}$  M (B.1 : vitesse d'attaque, B.2 : vitesse de repolarisation courte, B.3 : vitesse de repolarisation longue, B.4 : temps passé à plus de 50% de l'amplitude, B.5 : aire totale). SD 3 :  $n=6$ , HFHS 8w + gest-lact :  $n=7$ . Tous les histogrammes représentent les moyennes  $\pm$  sem. \*\*  $p < 0,01$  après un test de Mann-Whitney.

Les enregistrements EOG au niveau du cornet III n'ont révélé aucun effet de l'alimentation maternelle HFHS, quel que soit l'odorant utilisé et quel que soit le temps d'exposition des mères à l'aliment HFHS. En effet, pour les deux odorants testés sur l'EO principal, les valeurs des paramètres décrivant les courbes doses-réponses pour l'amplitude en fonction de la concentration odorante ( $-\log(\text{EC}_{50})$ ,  $k$ ,  $A_{\text{max}}$ ) chez les petits provenant d'une mère exposée à l'aliment HFHS étaient similaires à celles des petits du groupe SD associé. De plus les valeurs des caractéristiques cinétiques (vitesses d'attaque et de repolarisation, temps passé à plus de 50 % de l'amplitude, aire totale) des réponses pour une stimulation à une concentration odorante proche de l'EC50 n'étaient pas différentes entre les groupes HFHS et leur groupe SD associé.

En ce qui concerne la réponse de l'OS lors de stimulations par le PEA, un effet léger de l'alimentation maternelle HFHS a été observé. Dans le design expérimental 2, la vitesse de repolarisation longue pour une stimulation avec le PEA à  $10^{-3}$  M était supérieure de 55,8 % dans le groupe HFHS 8w + gest-lact par rapport au groupe SD 3 (Figure 42.B.3, (t, df) = (2,230, 20),  $p = 0,0374$ ), signifiant que les OSNs de l'OS mettent un peu plus de temps à restaurer leurs propriétés membranaires basales. Sur les signaux EOG bruts, une vitesse de repolarisation longue plus élevée se visualise par un retour du tracé à la ligne des 10 % de l'amplitude plus rapide (Figure 44).

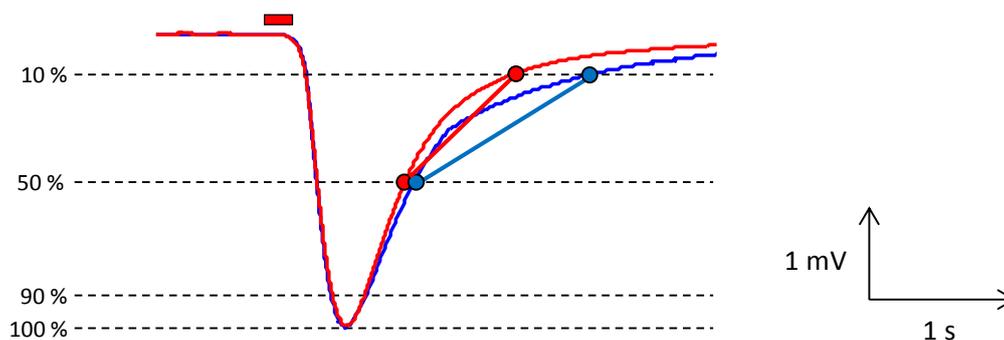


Figure 44 : Représentation schématique de signaux EOG individuels pour une stimulation de l'OS avec le PEA à  $10^{-3}$  M pour les groupes HFHS 8w + gest-lact et SD 3

Le rectangle rouge marque la durée de la stimulation odorante. Le tracé bleu correspond à un signal EOG d'un individu du groupe SD 3 et le tracé rouge correspond à un signal EOG d'un individu du groupe HFHS 8w + gest-lact. Les vitesses de repolarisation longue sont mesurées par les pentes des droites reliant les points bleus d'une part et rouges d'autre part.

Les réponses de l'OS aux stimulations par l'ACE étaient également légèrement modifiées par les deux types d'exposition à l'alimentation maternelle HFHS. Le temps passé à plus de 50 % de l'amplitude et l'aire totale étaient supérieures dans le groupe HFHS gest-lact par rapport au groupe SD 1 (respectivement d'un facteur 1,17 : figure 42.B.4,  $U = 18$ ,  $p = 0,0172$  et d'un facteur 1,56 : figure 42.B.5,  $(t, df) = (2,276, 18)$ ,  $p = 0,0353$ ). Sur les signaux EOG bruts, cet effet est visualisé par une réponse globale un peu plus large (Figure 45). Ces résultats suggèrent une cinétique de réponse globale des OSNs de l'OS plus lente même si aucune différence dans les vitesses d'attaque et de repolarisation n'a été mise en évidence.

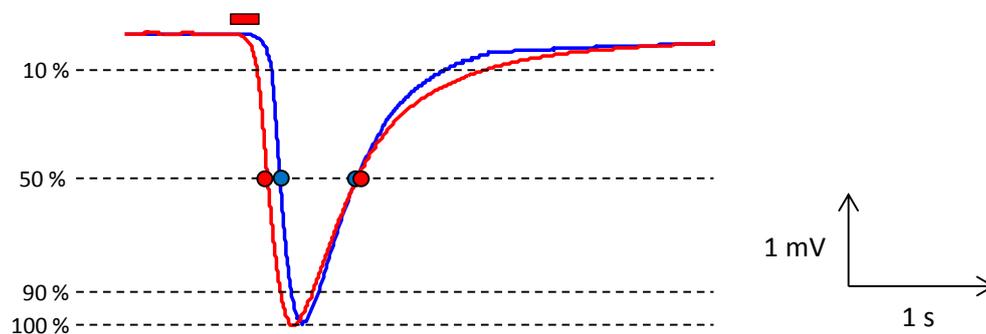


Figure 45 : Représentation schématique de signaux EOG individuels pour une stimulation de l'OS avec l'ACE à  $10^{-3}$  M pour les groupes HFHS gest-lact et SD 1

Le rectangle rouge marque la durée de la stimulation odorante. Le tracé bleu correspond à un signal EOG d'un individu du groupe SD 1 et le tracé rouge correspond à un signal EOG d'un individu du groupe HFHS gest-lact. Les distances entre les points bleus d'une part et rouges d'autre part correspondent au temps passé à plus de 50% de l'amplitude.

Enfin le groupe HFHS 8w + gest-lact présentait un coefficient de Hill ( $k$ ) 2,16 fois supérieur au groupe SD 3 (Figure 43.A.3,  $U = 1$ ,  $p = 0,0023$ ), indiquant une étendue dynamique plus faible des OSNs de l'OS. Autrement dit, les OSNs de l'OS montrent une réponse électrique pour une gamme de concentrations en ACE plus réduite, et en particulier répondent très faiblement aux concentrations les plus basses (Figure 46).

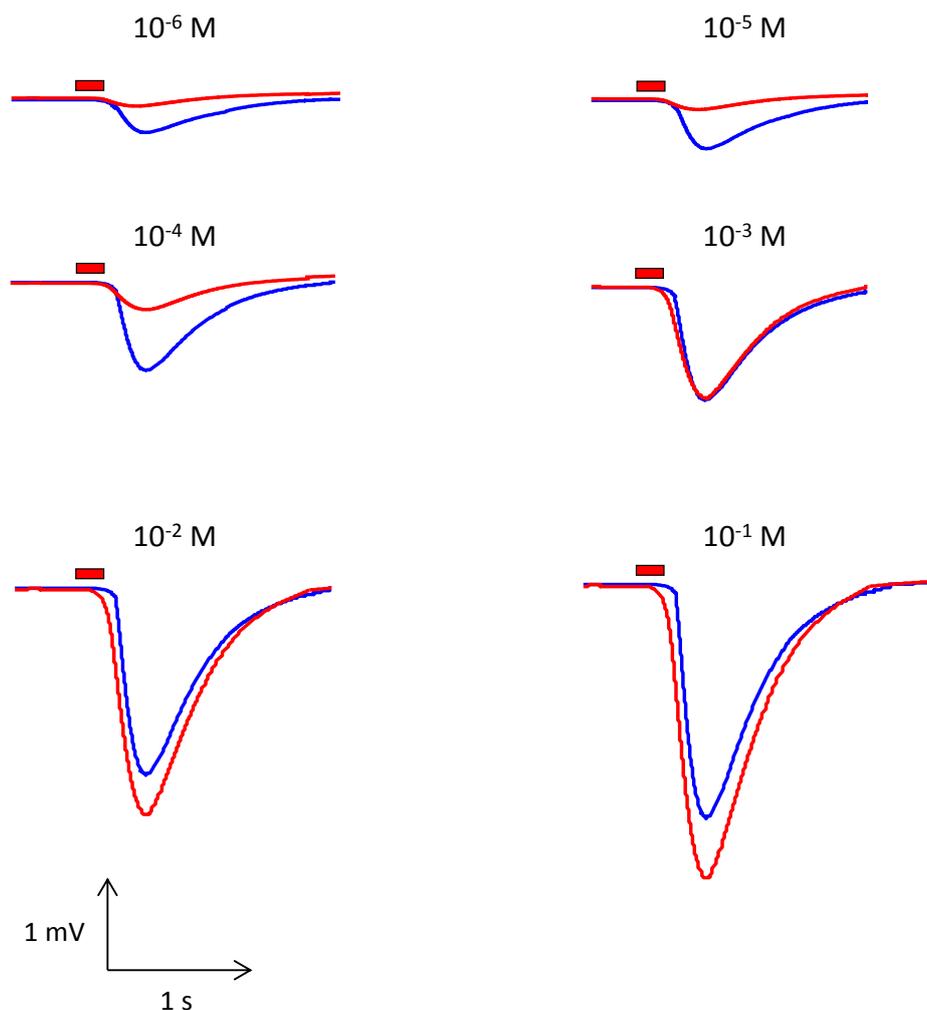


Figure 46 : Représentation schématique de signaux EOG individuels pour des stimulations de l'OS avec des concentrations croissantes d'ACE pour les groupes HFHS 8w + gest-lact et SD 3

Les rectangles rouges marquent la durée de la stimulation odorante. Les tracés bleus correspondent aux signaux EOG d'un individu du groupe SD 3 et les tracés rouges correspondent aux signaux EOG d'un individu du groupe HFHS 8w + gest-lact.

### 3. Bilan de l'étude EOG

Nous n'avons mis en évidence aucun effet de l'alimentation maternelle HFHS sur les réponses EOG de l'EO principal pour les deux odorants testés. La détection des molécules odorantes au sein de l'EO principal ne semble donc pas affectée par l'alimentation maternelle HFHS.

En revanche, l'alimentation maternelle semble influencer le fonctionnement de l'OS. Chez les petits du groupe HFHS gest-lact, les réponses de l'OS au PEA n'étaient pas différentes des réponses des petits du groupe SD associé. Pour les stimulations à l'ACE, les valeurs d'EC50 et de coefficient de Hill étaient similaires aux valeurs des petits du groupe SD, suggérant une sensibilité de l'OS à l'ACE similaire. Cependant, les valeurs de temps 50 et d'aire révèlent une cinétique globale de réponse plus lente. Un tel effet pourrait s'expliquer par une altération des mécanismes de terminaison du signal après activation de la cascade de transduction olfactive par l'ACE au sein des OSNs de l'OS. Nous avons quantifié l'expression de PDE, impliquée dans l'une des voies de terminaison du signal, au sein de la MO. Bien que nos résultats ont montré une expression similaire de PDE entre les groupes SD et HFHS, nous n'avons pas investigué son expression au sein de l'OS spécifiquement. De plus, d'autres mécanismes n'impliquant pas PDE pourraient être à l'origine d'une cinétique de réponse des OSNs plus longue dans l'OS des petits du groupe HFHS gest-lact tels qu'une activité diminuée des enzymes de dégradation des odorants. Quoiqu'il en soit, la restauration de l'activité basale des OSNs est cruciale lors de l'échantillonnage olfactif, puisqu'elle permet aux OSNs de maintenir leur activabilité. Ainsi, si les OSNs mettent plus de temps à retrouver leur activabilité, l'animal aura potentiellement plus de mal à naviguer vers une source odorante au sein d'un environnement rempli d'indices olfactifs, comme c'est le cas par exemple lors du test de nourriture enfouie.

Cependant, cette hypothèse est remise en cause par les résultats obtenus dans le groupe HFHS 8w + gest-lact. La cinétique de retour aux conditions basales était en effet plus rapide que dans le groupe SD 3 lors d'une stimulation au PEA. Ces résultats diffèrent des résultats obtenus dans le groupe HFHS gest-lact, et ce sur deux points :

- Les stimulations au PEA n'étaient pas affectées dans le groupe HFHS gest-lact, alors que leur cinétique est modifiée dans le groupe HFHS 8w + gest-lact.
- La modification de la cinétique pour les stimulations au PEA dans le groupe HFHS 8w + gest-lact reflète un retour à l'activité basale des OSNs plus rapide, alors que la modification de la cinétique pour les stimulations à l'ACE dans le groupe HFHS gest-lact reflète un retour plus lent.

Pour les stimulations à l'ACE dans le groupe HFHS 8w + gest-lact, contrairement au groupe HFHS gest-lact, la cinétique de réponse n'était pas affectée. En revanche l'étendue dynamique, c'est-à-dire la gamme de concentrations auxquelles les OSNs de l'OS ont répondu, était plus faible.

Pour tenter de tirer une conclusion quant à la modulation du fonctionnement de l'OS par l'alimentation maternelle HFHS malgré les discordances relevées, nous pouvons considérer les réponses EOG induites par chacun des deux odorants de manière distincte.

La seule modulation relevée pour les stimulations avec le PEA est une cinétique de retour à l'état basal des OSNs de l'EO plus rapide, dans le groupe HFHS 8w + gest-lact.

Les modulations observées pour les stimulations avec l'ACE sont une cinétique globale de réponse des OSNs de l'EO plus lente dans le groupe HFHS gest-lact, et une étendue dynamique des OSNs de l'EO plus faible dans le groupe HFHS 8w + gest-lact. Ces deux aspects peuvent expliquer une baisse de sensibilité olfactive : d'une part les OSNs mettent plus de temps à retrouver leur activabilité après une stimulation odorante, et d'autre part ils ne répondent pas aux faibles concentrations odorantes et arrivent rapidement à saturation.

Ainsi, l'alimentation maternelle HFHS a augmenté la cinétique de retour à l'état basal des OSNs de l'OS suite à une stimulation au PEA, seulement lorsque l'alimentation GS était reçue par les mères depuis la préconception.

L'alimentation maternelle HFHS semble avoir induit une baisse de performance des OSNs de l'OS pour des stimulations à l'ACE, selon deux mécanismes différents en fonction de la durée d'exposition des mères à l'aliment HFHS.

Les résultats obtenus en EOG pour attester du fonctionnement du système olfactif périphérique des petits ne sont néanmoins pas suffisants pour expliquer les altérations de la perception olfactive observées lors des tests comportementaux. L'alimentation maternelle HFHS n'a pas eu d'influence sur le fonctionnement de l'EO principal, et les résultats concernant le fonctionnement de l'OS sont très mitigés. Les perturbations du comportement olfactif des petits des groupes HFHS proviendraient donc majoritairement de dysfonctionnements dans le traitement central de l'information olfactive. Le dernier objectif présenté dans cette thèse consistait à explorer un aspect de l'intégration du signal olfactif au sein du BO d'une part, et l'activation des structures olfactives centrales suite à une exposition odorante d'autre part.

## Objectif 4 : Etude du traitement central de l'information olfactive

---

Une fois les molécules odorantes détectées au sein de l'EO, les axones des OSNs envoient l'information olfactive sous forme de PA à destination du BO. L'intégration du signal au sein du BO repose sur une activité neuronale complexe, impliquant de nombreux types cellulaires. Une perturbation anatomique et/ou fonctionnelle touchant l'un des types cellulaires du BO peut entraîner une altération dans le comportement olfactif.

Récemment, il a été montré qu'une alimentation maternelle HFHS induisait des modifications dans l'arborisation dendritique des neurones de l'amygdale, de l'hippocampe, et du cortex préfrontal chez le rat ([Janthakhin et al. 2017](#); [Rincel et al. 2017](#)).

Au sein du BO, l'arborisation dendritique des interneurones est particulièrement importante pour le traitement du signal olfactif. Parmi ces interneurones, les cellules GC interagissent avec les neurones-relais du BO pour façonner le message transmis aux autres régions du cerveau. Des travaux ont mis en évidence une corrélation entre le degré de complexité dendritique des cellules GC et les capacités olfactives dans des modèles de stress chez le rongeur ([Belnoue et al. 2016](#); [Siopi et al. 2016](#)).

Comme l'alimentation maternelle HFHS est susceptible d'impacter l'arborisation dendritique de différents types neuronaux, et que la complexité des dendrites des cellules GC semble associé à la performance olfactive, nous avons cherché à savoir si les cellules GC des petits HFHS présenteraient ou non une modification dans leur complexité dendritique, ce qui pourrait alors expliquer leur perception olfactive altérée.

En sortie du BO, le message olfactif est transmis aux structures olfactives corticales puis aux structures cérébrales tertiaires pour une intégration multimodale de l'information apportée par les molécules odorantes afin d'induire une réponse comportementale adaptée. Nous nous sommes penchés sur le degré d'activation des neurones au sein du cortex piriforme afin de déterminer si la perturbation de la perception olfactive des petits HFHS pouvait s'expliquer par une baisse d'activation de la structure olfactive corticale principale.

## I. Arborisation dendritique des cellules GC dans le BO

La morphologie des neurones du BO a été visualisée par marquage selon une coloration de Golgi Cox en suivant le protocole décrit par Zaqout et Kaindl (Zaqout & Kaindl 2016). Nous décrivons ici les principales étapes permettant de visualiser les neurones du BO.

### 1. Protocole expérimental

#### *a) Dissection et prélèvement du BO*

Les souriceaux ont été étourdis à l'isoflurane et sacrifiés par décapitation. La tête a été disséquée pour enlever la peau, la partie inférieure de la mâchoire et l'arrière de la tête. Le crâne a ensuite été enlevé morceau par morceau en faisant bien attention à ne pas endommager les BO. Les BO toujours fixés sur la partie antérieure du cerveau ont été retirés de la boîte crânienne, rincés à l'eau distillée et le bloc a immédiatement été immergé dans la solution d'imprégnation.

#### *b) Imprégnation du tissu et coupes transversales*

La solution d'imprégnation comprenait : 35 mM de di-chromate de potassium  $K_2Cr_2O_7$  (VWR Chemicals), 38 mM de chlorure de mercure  $HgCl_2$  (Alfa Aesar) et 43 mM de chromate de potassium  $K_2CrO_4$  (Alfa Aesar). Le socle cérébral et les BO étaient plongés dans un flacon contenant environ 5 mL de cette solution d'imprégnation pendant 10 jours à température ambiante et à l'obscurité. Après les premières 24h d'incubation, la solution était renouvelée. Durant cette étape, les neurones se chargent en particules de mercure.

Suite à cette étape d'imprégnation, les BO étaient transférés dans un flacon de solution cryoprotectante, composée de : 13 mM de phosphate de sodium hydrogéné monohydraté  $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$  (Sigma), 39 mM de phosphate de di-sodium hydrogéné  $Na_2HPO_4$  (Sigma), 154 mM de chlorure de sodium  $NaCl$  (Sigma), 880 mM de sucrose  $C_{12}H_{22}O_{11}$  (Sigma), 0,25 mM de polyvinylpyrrolidone PVP40 (Sigma) et 5,4 mM d'éthylène glycol soit 30 % en volume  $C_2H_6O_2$  (Sigma). De même que précédemment, la solution était changée après un jour, et les BO étaient laissés dans le cryoprotectant pendant une période totale de 7 jours au réfrigérateur à 4 °C, toujours à l'abri de la lumière.

Les BO sur leur socle cérébral étaient ensuite inclus en blocs d'agar à 4 % pour réaliser des coupes transversales de 100 µm d'épaisseur grâce à un vibratome (VT1200S Leica). La totalité des BO était coupée. La cuve du vibratome était remplie de solution cryoprotectante, et les coupes collectées étaient déposées au fur et à mesure sur des lames préalablement gélatinées (trempées dans une solution aqueuse contenant 1 % de gélatine (AppliChem) et 0,1 % d'alun de chrome (Alfa Aesar) et chauffée à 60 °C). Le surplus de cryoprotectant était retiré à l'aide de papier absorbant et les lames étaient laissées à sécher à plat, dans l'obscurité et à température ambiante, pendant 2 à 3 jours.

### *c) Développement des lames*

Après séchage complet des coupes, les lames étaient trempées dans une succession de bains pour révéler le marquage :

- 2 bains d'eau distillée (5 min chacun)
- Ethanol (Sigma) à 50 % (5 min)
- Ammoniaque 25 % (Sigma) (8 min)
- 2 bains d'eau distillée (5 min chacun)
- Sodium thiosulfate ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ , Sigma) dilué à 5 % (10 min dans le noir)
- 2 bains d'eau distillée (1 min chacun)
- Crésyl violet (Alfa Aesar) dilué à 1 % (5 min)
- 3 bains d'éthanol en séries (70 %, 95 % puis 100 %, 6 min chacun)
- Xylène (VWR Chemicals) (6 min)

Dans le milieu alcalin apporté par le bain d'ammoniac, le mercure imprégné dans les neurones est réduit en un composé noir sous l'action du sodium thiosulfate. Le bain de crésyl violet colore légèrement les coupes ce qui permet d'identifier les différentes couches concentriques du BO. Enfin, les bains d'éthanol et de xylène assurent la déshydratation des coupes, nécessaire à la préservation du tissu avant montage des lames.

Les coupes étaient ensuite recouvertes de milieu de montage (PERTEX, VWR Chemicals) et montées entre lame et lamelle en évitant de laisser des bulles d'air au contact du tissu.

#### *d) Analyse de la morphologie des cellules GC*

Une fois les lames sèches, les neurones des BO étaient visualisés grâce à un microscope Zeiss Axio Imager 2 au grossissement 20X et équipé d'une caméra Zeiss Axiocam MRm.

Les coupes à analyser étaient choisies dans la partie centrale du BO sur l'axe antéro-postérieur. Sur chaque coupe de BO, les différentes couches concentriques étaient identifiées grâce à la coloration au Crésyl violet. Les cellules GC étaient sélectionnées selon les critères suivants :

- Morphologie et localisation correspondant bien à une cellule GC : corps cellulaire au sein de la couche granulaire, dendrites basales courtes et peu nombreuses, une dendrite apicale qui s'étend et semble former des contacts avec les dendrites des cellules mitrales, portant éventuellement des dendrites secondaires (Nagayama et al. 2014).
- Neurone suffisamment isolé pour pouvoir suivre aisément le cheminement des dendrites.
- Neurone suffisamment imprégné pour bien visualiser toutes les branches dendritiques.
- Neurone ne présentant pas de troncation évidente dans l'arbre dendritique.

Un exemple de coupe de BO avec visualisation d'une GC remplissant ces critères est donné en Figure 47.

Les neurones remplissant les critères fixés ont été photographiés à l'aide du logiciel Axiovision (Zeiss) en prenant une image tous les 1  $\mu\text{m}$  sur l'axe en z.

Les branches dendritiques de chaque cellule GC ont été reconstruites de manière semi-automatique à partir des stacks d'images grâce au logiciel Fiji en utilisant le plugin Simple Neurite Tracer ([http://imagej.net/Simple\\_Neurite\\_Tracer](http://imagej.net/Simple_Neurite_Tracer)). Les dendrites principales et secondaires étaient alors dénombrées et les longueurs totales des arbres dendritiques étaient mesurées. Une analyse de Scholl était ensuite réalisée, toujours grâce au plugin Simple Neurite Tracer, sur les reconstructions neuronales en 3 dimensions. Le nombre d'intersections des dendrites avec des sphères virtuelles ayant pour centre le soma et de rayon croissant était calculé. Les quantifications ont été réalisées de manière séparée pour les arbres dendritiques apicaux et basaux.

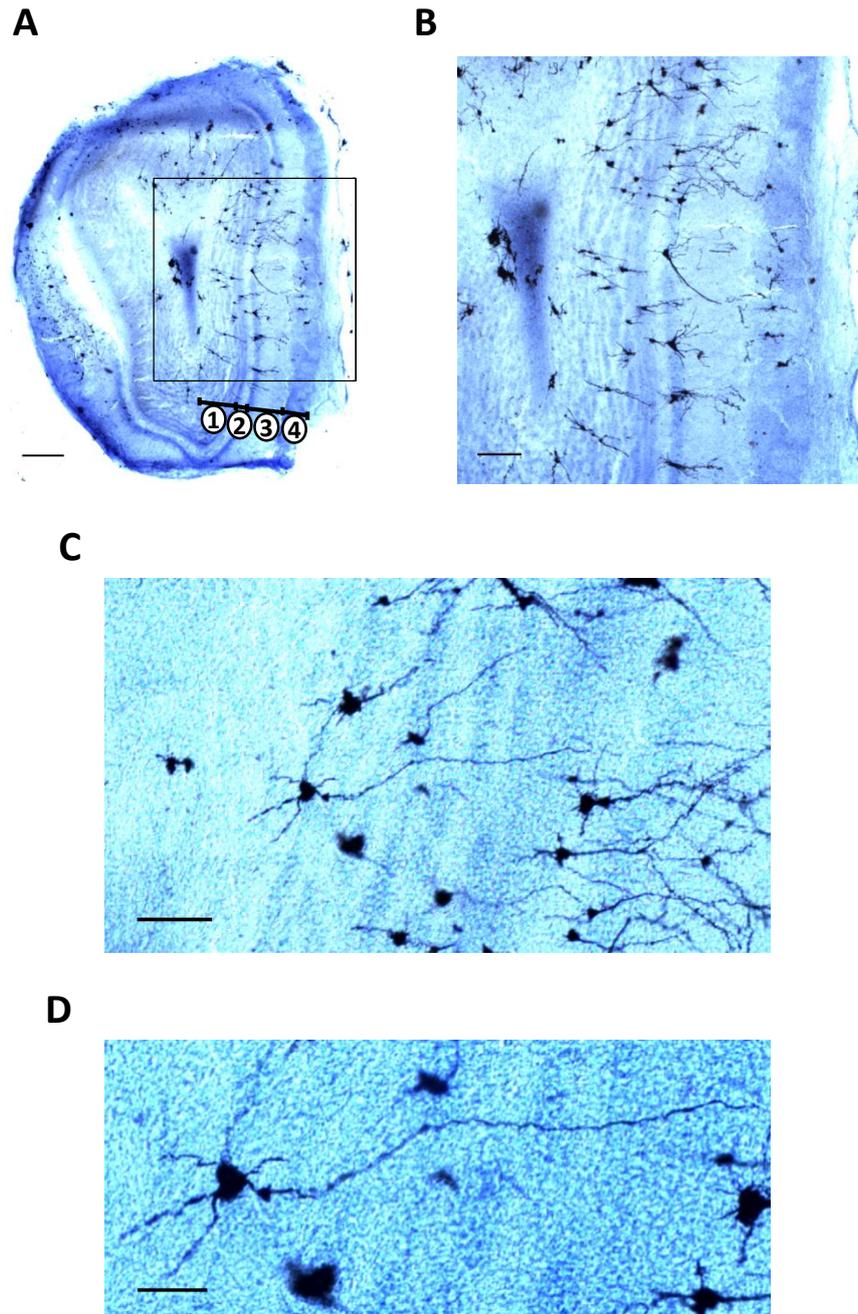


Figure 47 : Marquage des neurones bulbaires selon la méthode Golgi Cox

A. Exemple de coupe transversale de BO. 1 : Couche granulaire, 2 : Couche des cellules mitrales, 3 : Couche plexiforme externe, 4 : Couche glomérulaire. B. Agrandissement de la zone en A encadrée en noir. C et D : Exemple de GC sélectionnée pour l'analyse morphologique. Barres d'échelle s= 250  $\mu$ m (A), 125  $\mu$ m (B), 60  $\mu$ m (C) et 30  $\mu$ m (D).

## 2. Résultats et interprétation

L'analyse de la morphologie des GC a tout d'abord visé à comparer les degrés de ramification des arbres dendritiques entre les 3 groupes de souriceaux (Figure 48).

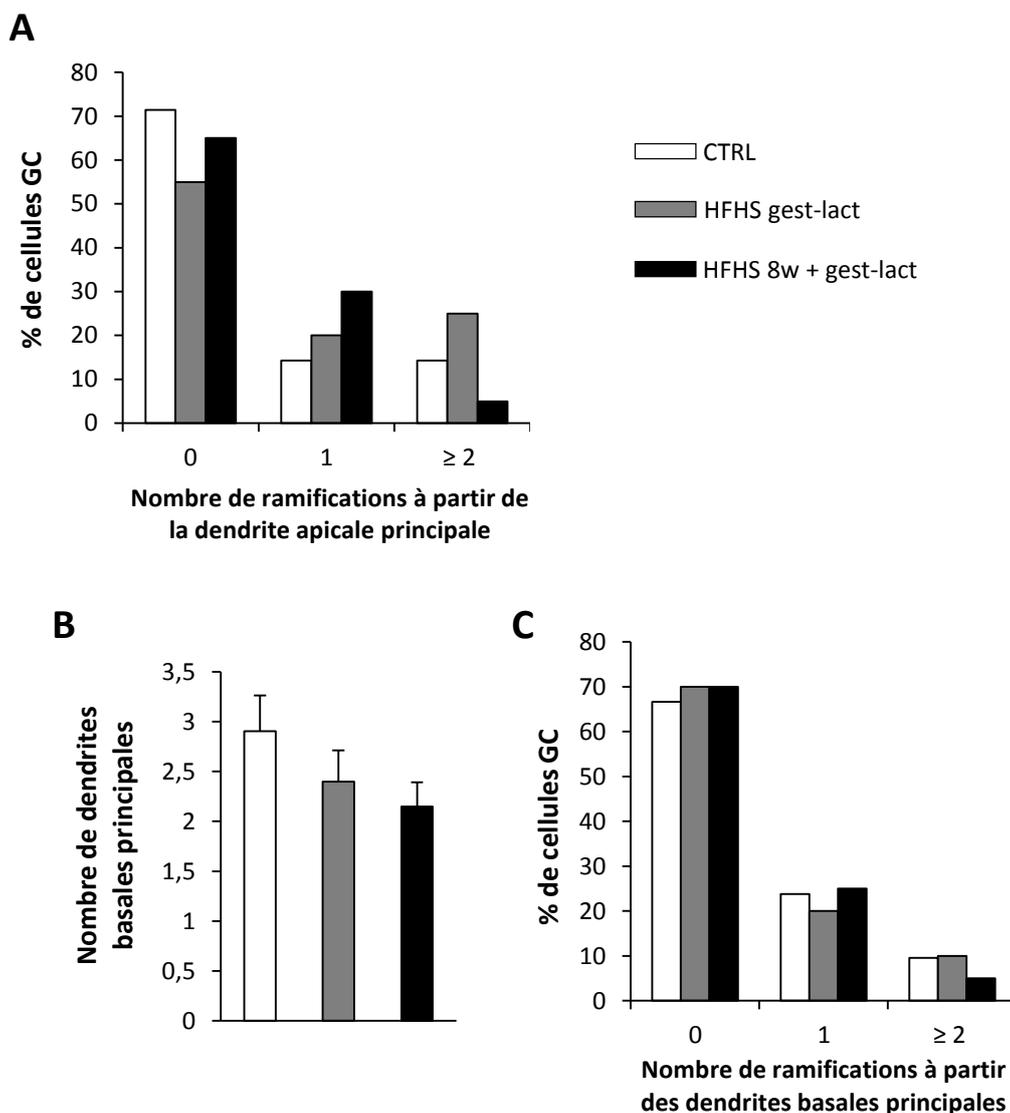


Figure 48 : Nombres de dendrites au sein des arbres apicaux et basaux des GC

A. Nombre de branches secondaires sur l'arbre dendritique apical des GC. B. Nombre de dendrites principales sur l'arbre dendritique basale. C. Nombre de branches secondaires à partir des dendrites basales principales. CTRL : n=21 GC provenant de 3 animaux différents, HFHS gest-lact : n=20 GC provenant de 2 animaux différents, HFHS 8w + gest-lact : n=20 GC provenant de 4 animaux différents. Un test de Kruskal-Wallis a été utilisé pour comparer le nombre moyen de dendrites basales principales entre les 3 groupes (B).

Au vu des effectifs, un test du Khi-2 a seulement pu être réalisé en regroupant les classes. En ce qui concerne les ramifications de l'arbre apical, le Khi-2 effectué en répartissant les GC en ramifiées ou non ramifiées au sein des 3 groupes n'a pas révélé de différence significative (Figure 48.A,  $\chi_{(2)}^2 = 1,21$ ,  $p > 0,05$ ).

Concernant l'arbre dendritique basal, aucune différence n'a été mise en évidence dans le nombre de dendrites principales (Figure 48.B,  $K = 2,968$ ,  $p = 0,2268$ ). Le Khi-2 effectué en répartissant les GC en ramifiées ou non ramifiées au sein des 3 groupes n'a pas non plus révélé de différence significative pour l'arbre dendritique basal (Figure 48.C,  $\chi_{(2)}^2 = 0,07$ ,  $p > 0,05$ ).

Un effet de l'alimentation maternelle HFHS a été mis en évidence sur la longueur totale des dendrites apicales. En effet, la longueur totale des dendrites apicales des GC du groupe HFHS gest-lact était 1,3 fois supérieure à celle du groupe CTRL, mais aussi du groupe HFHS 8w + gest-lact (Figure 49.A.1,  $F(2,58) = 6,051$ ,  $p = 0,0041$ ). L'analyse Sholl a révélé un effet global lié au groupe sur le nombre de branches dendritiques apicales en fonction de la distance par rapport au soma (Figure 49.B.1,  $F(2,812) = 15,63$ ,  $p < 0,001$ ).

En revanche, aucune différence n'a été mise en évidence en ce qui concerne la longueur totale (Figure 49.A.2,  $K = 0,5678$ ,  $p = 0,7528$ ) et la complexité (Figure 49.B.2,  $F(2,385) = 1,018$ ,  $p < 0,3625$ ) de l'arbre dendritique basal.

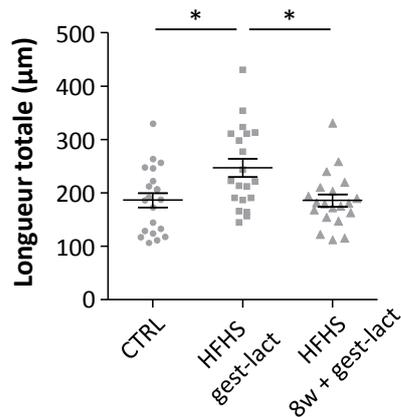
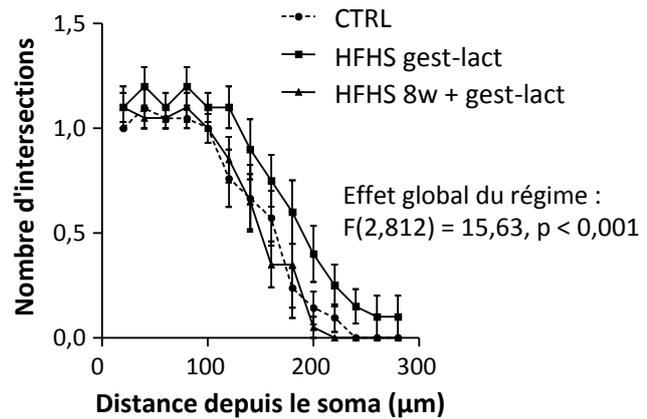
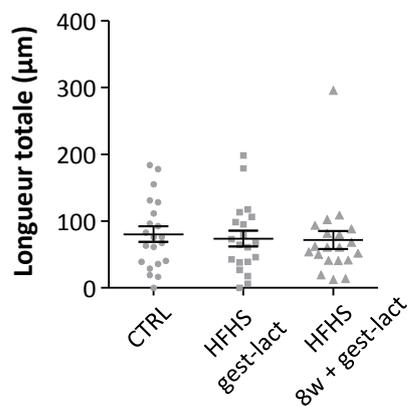
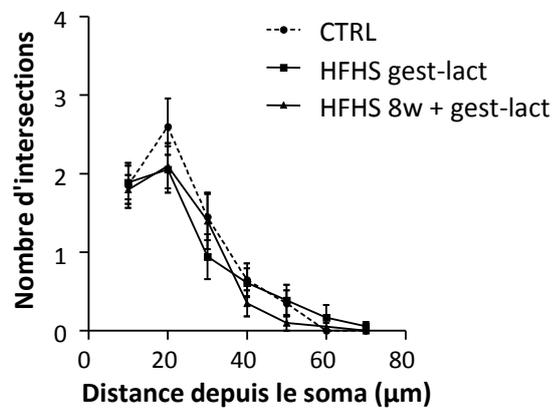
**A1****B1****A2****B2**

Figure 49 : Longueur totale et complexité des arbres dendritiques apicaux et basaux des GC

A. Longueur totale des dendrites constituant les arbres apicaux (1) et basaux (2). B. Nombre de branches dendritiques en fonction de la distance depuis le soma dans les arbres apicaux (1) et basaux (2). CTRL : n=21 GC provenant de 3 animaux différents, HFHS gest-lact : n=20 GC provenant de 2 animaux différents, HFHS 8w + gest-lact : n=20 GC provenant de 4 animaux différents. \*  $p < 0,05$  après une ANOVA à un facteur suivie de multiples comparaisons de Tukey.

Nos résultats suggèrent que l'alimentation maternelle HFHS influencerait la morphologie dendritique des GC chez la progéniture, en particulier la longueur et la complexité de l'arbre dendritique basal. Cependant cet effet est retrouvé seulement dans le groupe HFHS gest-lact.

Il est difficile de relier directement ce résultat avec les capacités olfactives des petits. En effet, dans les modèles d'induction d'un stress chez le rongeur, la baisse de performance

olfactive était associée à une diminution dans la complexité dendritique des GC (Belnoue et al. 2016; Siopi et al. 2016). Or dans notre modèle d'alimentation maternelle HFHS, nos résultats suggéreraient plutôt la relation inverse, puisque les petits du groupe HFHS gest-lact présentent une baisse de perception olfactive et une complexité dendritique des GC visiblement plus importante.

Néanmoins, les modèles de stress et d'alimentation maternelle HFHS représentent des conditions expérimentales complètement différentes, et il n'est pas exclu que ces deux modèles induisent des effets opposés. Les perturbations comportementales olfactives ne sont d'ailleurs pas identiques : les modèles de stress ont notamment montré une altération dans la capacité de discrimination odorante, qui n'a pas été évaluée dans nos protocoles d'alimentation maternelle HFHS. De plus, le marquage des GC dans les modèles de stress ciblaient spécifiquement les GC produites à l'âge adulte, tandis que notre méthode de coloration Golgi Cox marque tous les types neuronaux sans distinction. Les GC ont donc été sélectionnées selon leur morphologie, et il était impossible de différencier les GC nouvellement formées des GC produites plus précocement.

Nos résultats diffèrent également avec les études montrant une diminution de la complexité dendritique des neurones de l'hippocampe, de l'amygdale et du cortex pré-frontal suite à une exposition maternelle à l'aliment HFHS (Tozuka et al. 2010; Janthakhin et al. 2017; Rincel et al. 2017). Cette discordance pourrait provenir de particularités anatomiques et développementales du BO par rapport aux autres structures cérébrales.

La différence d'effets observés dans les groupes HFHS gest-lact et HFHS 8w + gest-lact est également difficile à interpréter. Les GC se forment principalement pendant la période post-natale, après la mise en place des neurones-relais du BO pendant le développement embryonnaire (Hinds 1968). Ainsi, l'alimentation maternelle HFHS pendant la lactation peut influencer la morphologie dendritique des GC d'une certaine manière dans le groupe HFHS gest-lact, et le statut métabolique de la mère pourrait entrer en jeu et induire un impact différent pour le groupe HFHS 8w + gest-lact.

Il serait nécessaire de reproduire l'expérimentation avec un nombre d'animaux plus conséquent afin de voir si ces résultats se confirment. Si tel est le cas, l'augmentation du degré de ramifications des GC chez les petits HFHS pourrait induire une inhibition globale des neurone-relais plus importante et ainsi diminuer l'output du BO suite à une stimulation odorante, pouvant alors apporter une explication à la baisse de sensibilité aux odeurs. Des

études complémentaires sur l'anatomie et la fonctionnalité des neurones du BO seront également requises pour valider ou non cette hypothèse.

## II. Activation des structures olfactives centrales après une brève exposition odorante

Pour investiguer le traitement central du signal olfactif, nous nous sommes finalement intéressés à l'activation du cortex piriforme suite à une exposition odorante. L'activation neuronale a été attestée par marquage immuno-histochimique de la protéine c-Fos. Il s'agit du facteur de transcription le plus fréquemment synthétisé dans les noyaux neuronaux à la suite d'un signal activateur.

### 1. Protocole expérimental

Cette dernière approche expérimentale a été menée sur le groupe de petits provenant d'une mère exposée à l'aliment HFHS pendant la gestation et la lactation uniquement et sur le groupe contrôle associé (SD 1). Les manipulations sur les petits du groupe HFHS 8w + gest-lact ont été effectuées en toute fin de thèse et n'ont pas donné de résultats exploitables.

#### *a) Préparation des animaux et exposition odorante*

La veille de l'expérimentation, les souriceaux étaient séparés de leur mère et placés en cage individuelle avec accès à l'eau et à l'aliment entretien, dans une pièce séparée de leur pièce d'élevage. Une boule à thé était également introduite dans la cage pour que les souris se familiarisent avec cet objet qui servira à réaliser l'exposition odorante. En effet, l'induction de c-Fos n'est pas spécifique de la réponse neuronale odorante. Au contraire, tout neurone activé, quelle qu'en soit la raison, va produire la protéine c-Fos. Il fallait donc réduire au maximum les stimuli au moment de l'exposition odorante, et l'introduction d'un objet nouveau en fait partie.

Le jour du test, la nourriture était retirée 1h avant l'exposition odorante. Une solution de PEA à  $10^{-5}$  M, préparée de la même manière que pour les manipulations d'EOG, était utilisée pour l'exposition odorante. 10  $\mu$ L de solution étaient imbibés sur un papier filtre (4 x 4 cm) ensuite introduit au sein de la boule à thé pendant 15 min. Après ce temps d'exposition, le papier filtre était retiré et la souris laissée sans dérangement pendant 1h30. Une anesthésie

profonde était ensuite réalisée par injection i.p. d'équithésine (mélange de pentobarbital (8,86 mg/mL), hydrate de chloral (42,5 mg/mL) et sulfate de magnésium (21,2 mg/mL), injection de 10-15 µL/g).

#### *b) Fixation et prélèvement du cerveau*

Une perfusion intracardiaque de paraformaldéhyde (PFA 4 %, Alfa Aesar) a été réalisée sur les animaux anesthésiés afin de fixer le tissu cérébral. Cette étape est cruciale pour le bon maintien de la cohésion tissulaire et pour figer les éléments lipidiques et protéiques, dont la protéine c-Fos. Le cerveau entier était ensuite prélevé et trempé entièrement dans un flacon de PFA 4 % pendant 2h avant d'être stocké à 4 °C au réfrigérateur dans une solution tampon phosphate saline (PBS, Sigma). Les cerveaux ont ensuite été inclus en blocs d'agar pour réaliser des coupes au vibratome de 40 µm d'épaisseur. Les coupes ont été conservées dans une solution contenant 30 % de sucrose pendant toute une nuit avant d'être stockées à -20 °C dans du cryoprotectant (Tris HCl 209 mM, Tris Base 39,6 mM, NaCl 154 mM, éthylène glycol 30 % en volume, glycérol 30 % en volume) jusqu'à réalisation de l'immuno-détection.

#### *c) Immuno-détection de la protéine c-Fos*

Les réactions d'immunohistochimie ont été réalisées sur coupes flottantes. Après blocage des peroxydases endogènes et des sites non spécifiques pour neutraliser le bruit de fond, les coupes ont été incubées avec l'anticorps primaire (Santa Cruz Biotechnology, SC52G 1/1000), dirigé contre la protéine c-Fos, puis avec l'anticorps secondaire (Clinisciences, BA9500 1/1000), dirigé contre l'anticorps primaire et biotinylé. Les coupes sont ensuite incubées avec la peroxydase de raifort (HRP) couplée à l'avidine (Vector Laboratories, PK-6100), les complexes avidine-biotine se forment alors au niveau des anticorps secondaires. La révélation de la protéine c-Fos est réalisée par ajout de diaminobenzidine (AMRESCO, 0430-5G), qui est transformée en précipité brun sous l'action de la peroxydase HRP.

Les coupes sont finalement déshydratées dans des bains successifs de concentration croissante d'éthanol (70°, 90° et 100° pendant 3 min chacun) puis dégraissées dans un bain de xylène (10 min), avant d'être montées entre lame et lamelle avec le milieu de montage PERTEX .

#### *d) Analyse du marquage dans les zones d'intérêt*

Les coupes à analyser ont été sélectionnées en fonction de repères anatomiques en comparaison avec un atlas stéréotaxique du cerveau de souris (Franklin & Paxinos 2008). Pour l'étude de la partie antérieure du cortex piriforme, les coupes choisies se situaient entre les figures 24 (Interaural 4,66 mm, Bregma 0,86 mm) et 29 (Interaural 4,06 mm, Bregma 0,26 mm) de l'atlas, et entre les figures 41 (Interaural 2,58 mm, Bregma -1,22 mm) et 46 (Interaural 1,98 mm, Bregma -1,82 mm) pour le cortex piriforme postérieur.

Les coupes ont été photographiées en mosaïques grâce au microscope Zeiss Axio Imager 2 au grossissement 10X, équipé d'une caméra Zeiss Axiocam MRm et piloté par le logiciel Axiovision. Les images ont été reconstituées avec le plugin Stitching de Fiji (Preibisch et al. 2009) puis traitées de manière automatisée avec une macro écrite sous Fiji.

Le cortex piriforme a été délimité sur chaque coupe, puis une analyse de particules a été réalisée pour détecter les noyaux neuronaux marqués par la coloration brune. Le seuil de densité optique pour attester de l'activation neuronale a été fixé à 55 % de la différence entre la densité optique du noyau le plus foncé sur la coupe entière (Figure 50, flèche rouge) et la densité optique de la coloration de fond. Ce seuillage a été effectué de manière indépendante sur chaque coupe et nous permettait de compenser les différences inévitables de coloration entre les différentes coupes (Illig & Haberly 2003; Prud'homme et al. 2009). De plus, des contraintes de taille (diamètre compris entre 5 et 10  $\mu\text{m}$ ) ont été appliquées pour la détection des noyaux marqués.

La quantification du marquage c-Fos a été exprimée en pourcentage d'aire marquée au sein du cortex piriforme (antérieur ou postérieur). La quantification a d'abord été réalisée de manière séparée pour les hémisphères droite et gauche, puis la quantification moyenne au sein des deux hémisphères a été calculée.

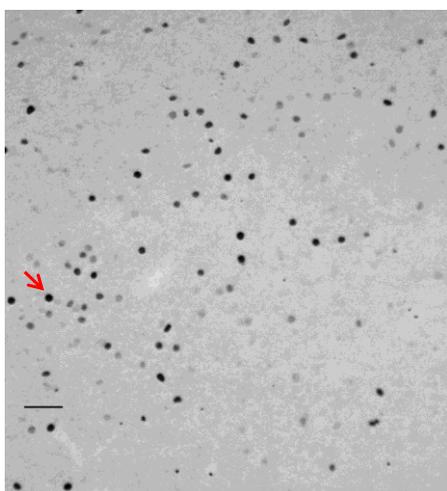


Figure 50 : Exemple de marquage c-Fos sur une coupe de cerveau de souris après exposition odorante

La flèche rouge indique le noyau le plus foncé. La barre d'échelle correspond à 50  $\mu\text{m}$ .

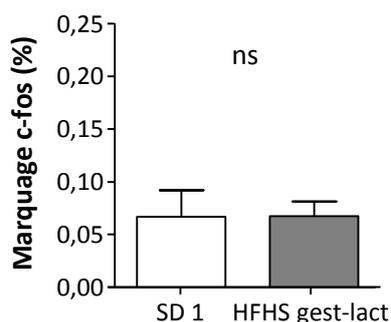
## 2. Résultats et interprétation

La quantification du marquage c-Fos dans le cortex piriforme antérieur et postérieur est représentée en Figure 51.

### A Piriforme antérieur

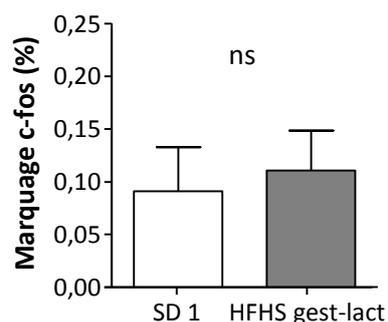
#### A1

*Hémisphère gauche*



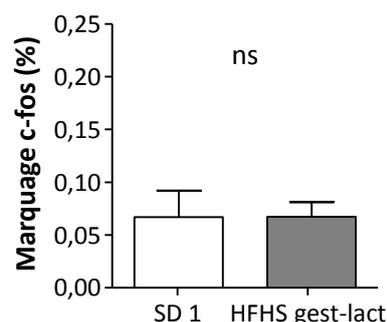
#### A2

*Hémisphère droite*



#### A3

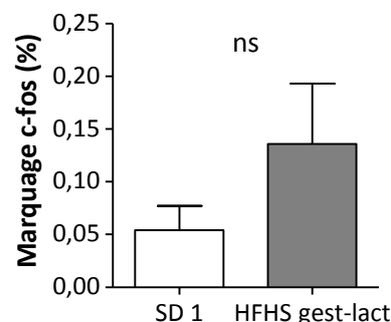
*Moyenne des deux hémisphères*



### B Piriforme postérieur

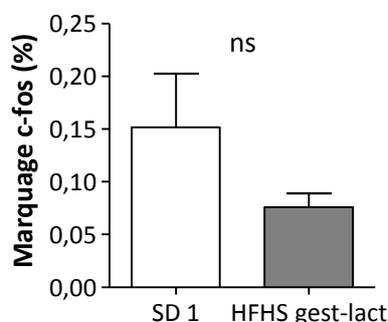
#### B1

*Hémisphère gauche*



#### B2

*Hémisphère droite*



#### B3

*Moyenne des deux hémisphères*

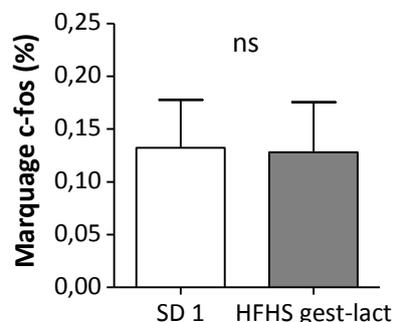


Figure 51 : Activation neuronale au sein du cortex piriforme suite à une exposition odorante

Le marquage de la protéine C-FOS a été mesuré dans la partie antérieure (A) et postérieure (B) du cortex piriforme. Le marquage a été quantifié au sein de l'hémisphère gauche (1) et de l'hémisphère droite (2) séparément, puis la valeur moyenne sur les deux hémisphères a été calculée (3). Au minimum, 6 coupes provenant d'au moins 3 animaux différents ont été analysées pour chaque groupe. Toutes les données sont représentées en moyennes  $\pm$  sem.

Aucun effet de l'alimentation maternelle HFHS sur l'activation neuronale au sein du cortex piriforme n'a été mis en évidence. Pour la partie antérieure du cortex piriforme, le marquage c-Fos représentait environ 0,067 % de l'aire totale de la structure (0,0670 % pour SD 1 et 0,0674 % pour HFHS gest-lact), et environ 0,13 % de l'aire totale pour la partie postérieure (0,132 % pour SD 1 et 0,128 % pour HFHS gest-lact).

Nous avons utilisé le PEA concentré à  $10^{-5}$  M pour réaliser l'exposition odorante avant de quantifier l'expression de c-Fos au sein du cortex piriforme. Cette concentration a été choisie suite aux résultats obtenus en pléthysmographie : les individus SD augmentaient leur flairage en réponse à la stimulation au PEA à  $10^{-5}$  M, tandis que les individus HFHS ne réagissaient pas. Bien que les modalités d'exposition odorante soient différentes entre les deux expériences (diffusion de l'odeur dans le pléthysmographe pour le comportement de flairage et à travers une boule à thé pour le marquage c-Fos), nos données suggèrent que la différence de flairage induite par le PEA à  $10^{-5}$  M n'est pas corrélée à une différence d'activation neuronale au sein du cortex piriforme.

Il serait intéressant de reproduire cette expérience avec une autre source odorante, et notamment avec une exposition à l'odeur de la céréale Crunch utilisée dans le test de nourriture enfouie. De plus, l'étude du marquage c-Fos au sein d'autres structures impliquées dans la perception olfactive, comme l'amygdale, l'hippocampe et l'hypothalamus latéral, est envisagée.

Pour conclure ce chapitre, nous avons montré que l'alimentation maternelle HFHS semble impacter la morphologie dendritique des GC au sein du BO. Les effets observés diffèrent selon le temps d'exposition maternelle à l'aliment HFHS, et nos résultats ne permettent pas d'expliquer complètement les perturbations olfactives mises en évidence lors des tests comportementaux.

L'activation neuronale au sein du cortex piriforme suite à une exposition au PEA à  $10^{-5}$  M n'a pas été impactée par l'alimentation maternelle HFHS. Une étude approfondie de l'activation neuronale dans les autres structures cérébrales olfactives et en réponse à d'autres stimulations odorantes fournirait des informations supplémentaires quant au traitement central du signal olfactif entre les petits nés d'une mère exposée à l'aliment HFHS et les petits nés d'une mère sous alimentation SD.

## Objectif 5 : Comparaison avec des régimes maternels normo-lipidiques, déficients ou enrichis en AGPI n-3

---

Les habitudes alimentaires actuelles, de type HFHS, contiennent un apport conséquent en lipides, mais également une répartition différente des classes d'acides gras.

Au sein de la population française adulte, la moitié de la ration lipidique journalière est constituée de graisses saturées (ANSES 2017) et les apports en AGPI n-3 à longue chaîne apparaissent insuffisants au vu des recommandations nutritionnelles (ANSES 2003).

Les AGPI n-6 favorisent l'adipogenèse et le stockage des graisses et présentent une action pro-inflammatoire et pro-thrombique (Muhlhausler & Ailhaud 2013). A l'inverse, la consommation d'AGPI n-3 est associée à de nombreux bénéfices sur la santé, comme une baisse des taux de triglycérides plasmatiques, une amélioration de la sensibilité à l'insuline, une réduction de la pression artérielle et diminution du risque de diabète et de maladies cardiovasculaires (Martínez-Victoria & Yago 2012).

Alors qu'un ratio n-6/n-3 égal à 5 est préconisé au sein des apports lipidiques journaliers, le rapport réel est plutôt supérieur à 10 au sein de la population adulte (ANSES 2003).

Des études d'observation ont montré que l'ingestion d'AGPI n-3 à longue chaîne chez la femme enceinte était associée à une augmentation du poids de naissance du nouveau-né et à une réduction du risque de naissance prématurée (Drouillet et al. 2009). La disponibilité en AGPI n-3 à longue chaîne serait un facteur limitant pour la croissance et le développement du nouveau-né et du jeune enfant (Innis 2007), et une supplémentation en AGPI n-3 pendant la grossesse et l'allaitement améliorerait le développement cognitif et visuel de l'enfant (Decsi & Koletzko 2005).

Dans le cadre d'un projet en cours au sein de notre équipe, des souris femelles ont été nourries avec des régimes normo-lipidiques enrichis ou déficients en AGPI n-3 pendant la gestation et la lactation, dans le but d'étudier les effets des AGPI n-3 sur la signalisation olfactive périphérique de la progéniture. J'ai pris part à cette étude en réalisant le test

comportemental de flairage induit par l'odeur du PEA sur les petits à 3 semaines de vie, ainsi que des enregistrements EOG sur l'EO principal en réponse à des stimulations odorantes au PEA. Ainsi, j'ai pu comparer l'impact de deux types d'alimentation maternelle déséquilibrée : un régime HFHS et un régime normo-lipidique mais déficient en AGPI n-3 (DEF), sur le comportement olfactif de la progéniture et sur la réponse odorante de l'EO.

## I. Caractéristiques des régimes utilisés

Trois régimes contenant 5% de lipides ont été préparés par l'unité de préparation des aliments expérimentaux du centre INRA de Jouy-en-Josas à partir de mélanges d'huiles de palme, de colza, de tournesol, d'oléisol et de poisson (Tableau 6) :

- un régime dit équilibré (EQU) en AGPI n-6 et n-3 (rapport n-6/n-3= 5,8)
- un régime déficient (DEF) en AGPI n-3 (rapport n-6/n-3= 116,7)
- un régime enrichi (ENR) en AGPI n-3 (rapport n-6/n-3= 2,8)

	<b>EQU</b>	<b>DEF</b>	<b>ENR</b>	<b>SD</b>	<b>HFHS</b>
<b>Lipides totaux</b>	5,0	5,0	5,0	5,8	22,5
<b>AGS</b>	19,59	22,44	16,55	18,52	37,05
<b>AGMI</b>	61,08	60,52	59,43	23,62	44,65
<b>AGPI</b>	19,33	17,05	24,03	57,78	18,31
<b>n-6</b>	16,49	16,91	17,76	50,91	16,76
<b>n-3</b>	2,84	0,15	6,27	6,77	1,56
<b>n-6/n-3</b>	5,80	116,73	2,83	7,53	10,78

Tableau 6 : Composition lipidique des régimes maternels utilisés dans le projet n-3

La quantité de lipides totaux est exprimée en pourcentage dans l'aliment, et les teneurs en AG sont exprimées en pourcentage des lipides totaux.

Les régimes EQU, DEF et ENR ont été administrés à des femelles C57BL/6 pendant la gestation et la lactation. De la même manière que précédemment, flairage induit par le PEA a été évalué chez les petits au moment du sevrage au sein du pléthysmographe, puis la réponse odorante de l'EO a été évaluée au niveau du cornet III suite à des stimulations au PEA.

## II. Comportement de flairage induit par le PEA

Les indices de flairage ont été calculés pour chaque stimulation en prenant le groupe EQU en condition basale (avant la stimulation odorante) comme référence (Figure 53).

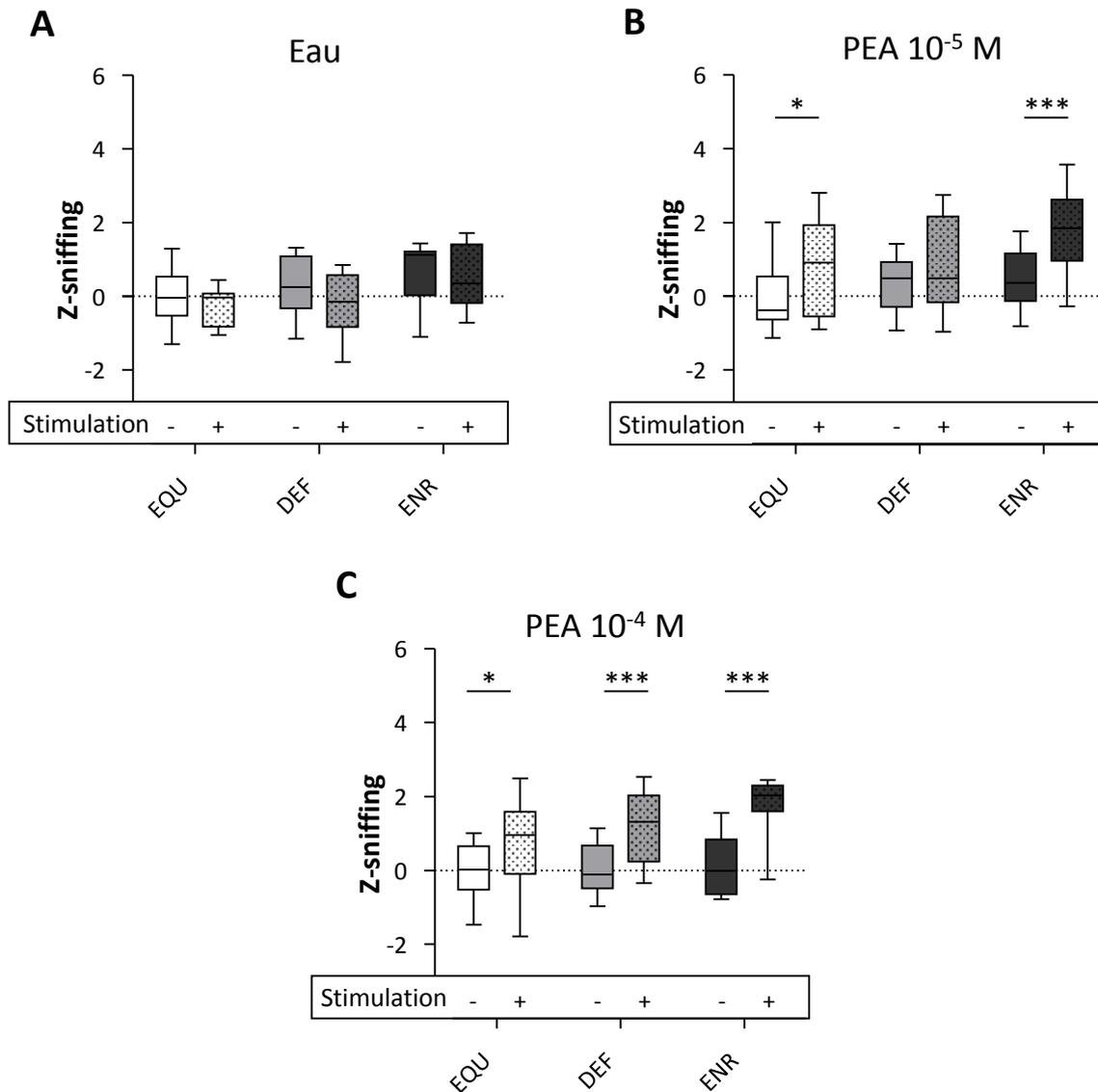


Figure 52 : Comportement de flairage induit par l'odeur du PEA chez les souriceaux des groupes EQU, DEF et ENR

Indices de flairage (« Z-sniffing ») calculés lors de la dernière stimulation à l'eau distillée (A), et des stimulations odorantes : PEA à 10<sup>-5</sup> M (B) puis PEA à 10<sup>-4</sup> M (C). L'encadré « stimulation » indique les périodes de respiration basale « - » et de stimulation « + ». EQU : n=10, DEF : n=13, ENR : n=12. Les données sont représentées en boîtes à moustache : la barre horizontale représente la valeur médiane au sein du rectangle allant du 1<sup>er</sup> au 3<sup>ème</sup> quartile, et les segments mènent aux valeurs extrêmes. \* p < 0,05, \*\*\* p < 0,001 après une ANOVA à deux facteurs (groupe, temps : avant ou pendant la stimulation) sur mesures répétées suivie de comparaisons multiples de Bonferroni.

Pour les 3 stimulations, nous avons de nouveau vérifié que l'indice de flairage pour la période de respiration basale n'était pas significativement différent entre les groupes (Figure 52, rectangles non pointillés, effet groupe :  $F(2,32) = 3,15$ ,  $p = 0,056$ ,  $F(2,32) = 1,841$ ,  $p = 0,175$ ,  $F(2,32) = 1,391$ ,  $p = 0,264$ , pour la stimulation à l'eau distillée, au PEA à  $10^{-5}$  M et au PEA à  $10^{-4}$  M respectivement).

Nous avons également vérifié qu'une stimulation non odorante n'induisait pas d'augmentation de l'activité respiratoire, et ce dans aucun des 3 groupes (Figure 52.A, effet temps :  $F(1,32) = 3,167$ ,  $p = 0,057$ ).

Lors de la présentation du PEA à  $10^{-5}$  M, seuls les souriceaux des groupes EQU et ENR ont augmenté leur flairage en réponse à la stimulation odorante (Figure 52.B, effet temps :  $F(1,32) = 33,41$ ,  $p < 0,001$  ; tests post-hoc période basale vs stimulation odorante : EQU :  $t = 2,878$ ,  $p < 0,05$ , DEF :  $t = 2,325$ ,  $p > 0,05$ , ENR :  $t = 4,828$ ,  $p < 0,001$ ). Les souriceaux des 3 groupes ont ensuite montré une augmentation de flairage lors de la présentation du PEA à  $10^{-4}$  M (Figure 52.C, effet temps :  $F(1,32) = 80,97$ ,  $p < 0,001$  ; tests post-hoc période basale vs stimulation odorante : EQU :  $t = 2,823$ ,  $p < 0,05$ , DEF :  $t = 5,501$ ,  $p < 0,001$ , ENR :  $t = 7,525$ ,  $p < 0,001$ ).

Les réponses comportementales du groupe DEF font écho aux réponses comportementales des deux groupes HFHS : ces souriceaux ne réagissent pas à la stimulation au PEA à  $10^{-5}$  M, mais augmentent leur flairage lorsque le PEA est présenté à  $10^{-4}$  M. Les petits du groupe ENR n'ont en revanche pas montré de différence comportementale par rapport aux petits du groupe EQU.

### III. Activité électrophysiologique de l'EO en réponse au PEA

L'amplitude de réponse de l'EO aux stimulations par des concentrations croissantes en PEA et les caractéristiques cinétiques de cette réponse n'ont pas été affectées par l'alimentation maternelle DEF ou ENR (Figure 53).

Les données obtenues en EOG sur les petits des groupes EQU et DEF (projet n-3) sont très comparables aux données obtenues sur les petits des groupes SD1 et HFHS gest-lact (projet HFHS) (Figure 36). En stimulant l'EO avec le PEA et en enregistrant l'activité électrique au niveau du cornet III, les valeurs de  $-\log(EC_{50})$  et  $A_{max}$  étaient similaires (environ 2 et 6 respectivement), et les paramètres cinétiques se situaient dans les mêmes ordres de

grandeur. Le coefficient de Hill semblait légèrement supérieur chez les petits au sein du projet n-3.

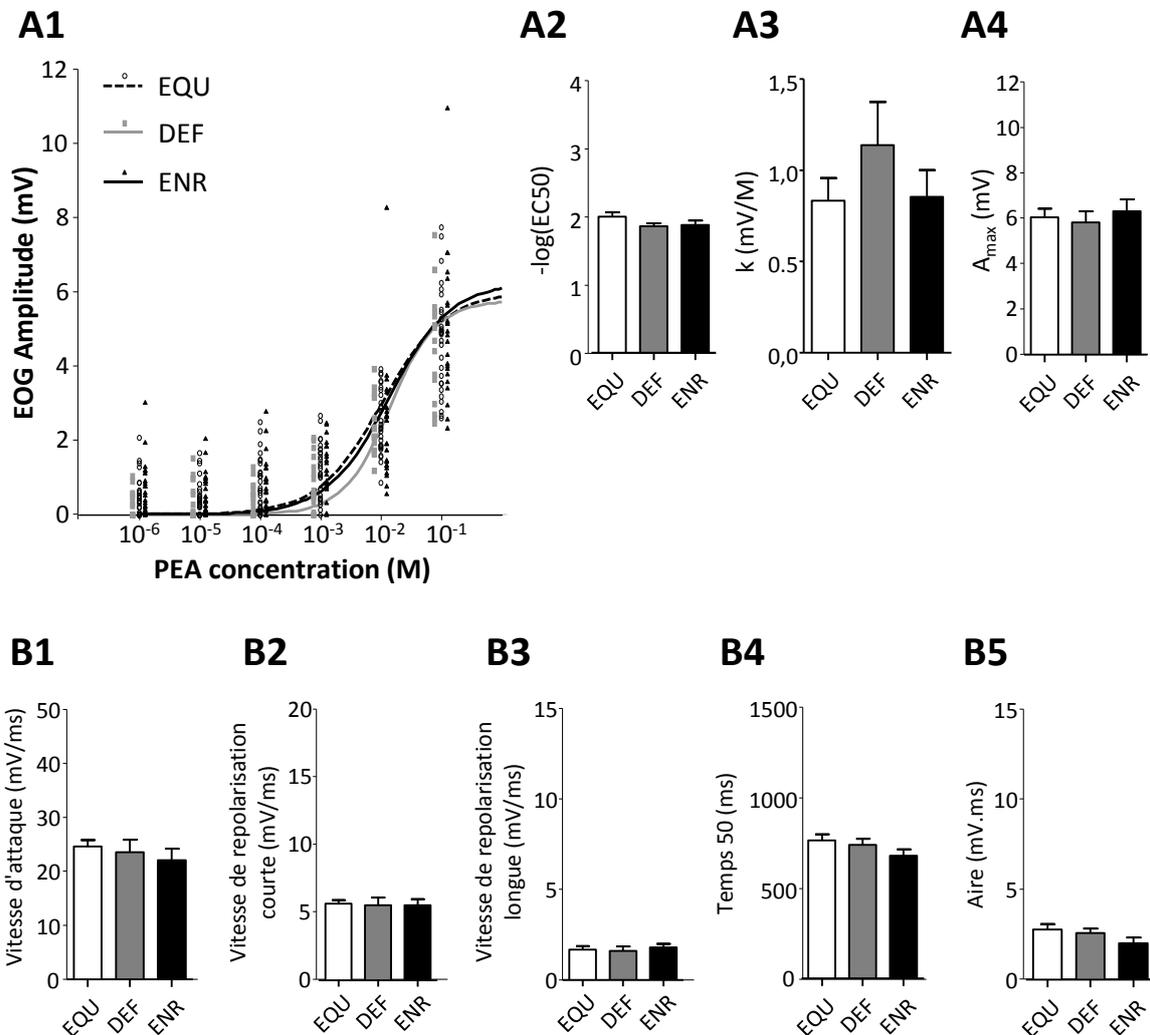


Figure 53 : Données obtenues en EOG pour des stimulations du cornet III avec des concentrations croissantes de PEA – Groupes EQU, DEF et ENR

Les courbes doses-réponses (A.1) représentent l'amplitude du signal EOG en fonction de la concentration en PEA utilisée pour la stimulation odorante. Chaque symbole correspond à une donnée individuelle brute. Pour chacun des groupes la courbe moyenne des approximations individuelles par l'équation de Hill est représentée. En A.2, A.3 et A.4 figurent les paramètres moyens des approximations de Hill pour les courbes doses-réponses de l'amplitude en fonction de la concentration ( $-\log(\text{EC}_{50})$ ,  $k$  et  $A_{\text{max}}$ ). Les autres caractéristiques du signal EOG ont été calculées pour la stimulation odorante à  $10^{-2}$  M (B.1 : vitesse d'attaque, B.2 : vitesse de repolarisation courte, B.3 : vitesse de repolarisation longue, B.4 : temps passé à plus de 50% de l'amplitude, B.5 : aire totale). EQU :  $n=28$ , DEF :  $n=17$ , ENR :  $n=23$ .

En conclusion, nous avons observé une altération similaire du comportement de flairage induit par le PEA dans les groupes DEF et HFHS, qui n'était pas associée à une modification de sensibilité de l'EO principal au PEA. Nous n'avons pas mis en évidence d'effet de l'alimentation maternelle ENR par rapport à l'alimentation EQU.

Concernant les souris du projet HFHS, les femelles CTRL en milieu de gestation mangeaient environ 4,3 g de croquettes SD par jour contre 3,4 g chez les femelles sous HFHS. Ainsi, les femelles CTRL ingéraient par jour 2,5 g d'AGPI, dont 2,2 g d'AGPI n-6 et 0,3 g d'AGPI n-3 ; tandis que les femelles HFHS ingéraient 0,6 g d'AGPI, dont 0,56 g d'AGPI n-6 et 0,04 g d'AGPI n-3.

L'apport en AGPI n-3 des femelles HFHS était quasi nul, tout comme les femelles du groupe DEF (0,1 % d'AGPI n-3 dans le régime DEF) dans le projet n-3.

Des déficits olfactifs similaires ont été observés chez les petits provenant de mères soumises à deux types d'alimentation pendant la gestation et la lactation, toutes deux caractérisées par une déficience en AGPI n-3. Cet apport plus faible en AGPI n-3 pendant les périodes de développement des petits pourrait en partie expliquer les altérations olfactives observées chez la progéniture.

# Discussion générale

L'objectif général de cette thèse était d'explorer l'impact d'une alimentation maternelle HFHS pendant les périodes de développement sur la physiologie olfactive de la progéniture. La caractérisation métabolique du modèle a révélé que nos protocoles d'alimentation maternelle HFHS modifiaient la composition lipidique du lait maternel et induisait un surpoids et un excès de masse grasse épидидymaire chez la progéniture à l'âge de 3 semaines, associés à une hyperleptinémie. Les deux approches comportementales mises en œuvre démontrent une altération de la perception olfactive chez la progéniture des mères exposées à l'aliment HFHS, attestée par un temps plus long pour retrouver un objet alimentaire grâce aux indices odorants (test de nourriture enfouie) et par une activité de flairage induite par l'odeur du PEA supprimée pour la plus faible concentration testée (technique de pléthysmographie). Les techniques utilisées pour investiguer le fonctionnement du système olfactif périphérique (qPCR et EOG) n'ont pas révélé d'effet majeur de l'alimentation maternelle HFHS sur la sensibilité des OSNs de l'EO principal, mais le fonctionnement de l'OS était impacté. Au sein du BO, la morphologie des GC semble modifiée par l'alimentation maternelle HFHS. En revanche l'alimentation maternelle HFHS n'a pas eu de conséquences sur l'activation du cortex piriforme suite à une exposition odorante.

## **I. Alimentation maternelle HFHS et comportement olfactif des petits au moment du sevrage**

Chez la souris adulte, il a été montré qu'une exposition à un aliment HFHS pendant 6 mois induisait des altérations comportementales lors de tests olfactifs. Lorsque l'aliment HFHS était donné à partir de 11 semaines de vie, les animaux présentaient une baisse de perception pour l'odeur d'un biscuit salé lors d'un test de nourriture enfouie, non retrouvée pour l'odeur d'une céréale chocolatée (Tucker et al. 2012a). Les animaux n'étaient pas mis à jeun lors des sessions expérimentales, et n'étaient pas préalablement habitués aux objets alimentaires. Un phénomène de néophobie ou de palatabilité plus faible pour le biscuit salé chez les souris exposées à l'aliment HFHS peut être à l'origine de la différence observée entre les deux objets alimentaires, tandis que la céréale chocolatée serait très palatable. De plus, le test avec la céréale chocolatée avait lieu systématiquement 1 semaine après le test avec le biscuit salé, les souris pouvaient alors avoir eu le temps de mieux comprendre la tâche et ainsi être plus performantes. Lorsque l'aliment HFHS était donné à partir du sevrage, les auteurs rapportent une baisse dans la capacité de discrimination entre l'acétate d'éthyle à 5 % et l'eau (Thiebaud et al. 2014). Des données non encore publiées de notre laboratoire montrent qu'après 2 mois seulement d'exposition à l'aliment HFHS, les souris

présentent une baisse de perception pour l'odeur de fromage (emmental Leerdammer<sup>MD</sup>) lors d'un test de nourriture enfouie.

Une alimentation de type diabétoène, riche en fructose, induit également une baisse de performance olfactive dans un test de nourriture enfouie utilisant l'emmental comme objet alimentaire, ainsi qu'une altération de la capacité de discrimination entre l'acétophénone et l'octanol, deux molécules aux structures chimiques très distinctes (Rivière et al. 2016).

En revanche, les capacités olfactives de jeunes souris exposées à l'aliment HFHS à travers l'alimentation maternelle n'ont pas été étudiées.

Récemment, Janthakhin et collaborateurs ont montré un effet de l'alimentation maternelle HFHS sur la capacité des rats à mémoriser une aversion olfactive conditionnée, mais sans perturbation de la capacité à retenir une préférence olfactive conditionnée en utilisant les deux mêmes odeurs (benzaldéhyde et acétate d'isopentyle) aux mêmes concentrations dans les deux tests (Janthakhin et al. 2017). Ainsi, la détection des odeurs n'étaient pas perturbée, mais les rats présentaient une altération dans la mise en place ou dans le rappel de l'association odeur-malaise induite lors de l'aversion olfactive conditionnée. Ce phénomène constitue une tâche mnésique dépendante de l'amygdale, et les auteurs ont mis en relation cette réduction de performance mnésique avec une baisse de complexité dendritique au sein des neurones de l'amygdale.

A notre connaissance, nous montrons donc pour la première fois une altération de la perception des odeurs chez de jeunes individus suite à une alimentation maternelle HFHS. Comment se caractérise la perception olfactive altérée en termes de capacités olfactives ?

Au vu de nos résultats lors du test de nourriture enfouie et dans le dispositif de pléthysmographie, une baisse dans la capacité de détection des odeurs semble le plus probable. Le seuil de détection d'une odeur est la plus petite intensité perçue de cette odeur. Cette habileté à percevoir des faibles intensités odorantes est étroitement liée à la capacité de discrimination d'une odeur particulière avec les odeurs environnantes. Il serait intéressant de tester plus précisément les capacités de discrimination des petits entre des odeurs portées par des molécules chimiques de structure proche (par exemple les énantiomères de la carvone) ou en utilisant des mélanges d'odorants dans des proportions différentes.

De plus, il n'est pas exclu que le temps plus long mis pour retrouver la céréale enfouie lors du test de *buried food* révèle une perturbation de mémorisation olfactive. En effet, lors de la

phase d'habituation des petits à l'objet alimentaire, ces derniers doivent associer l'odeur de la céréale avec sa valeur alimentaire et sa palatabilité. Lors des essais avec la céréale enfouie, l'animal mis à jeun pendant 5 heures est en recherche active de nourriture, et il mettra plus de temps à retrouver la céréale d'une part s'il n'arrive pas à détecter les indices odorants dégagés, et d'autre part s'il les détecte mais qu'il ne les a pas associés avec la représentation d'un aliment comestible et palatable. Pour tester cette mise en mémoire de l'information olfactive associée à un objet alimentaire, un test de go/no-go pourrait être mis en place afin d'évaluer le temps d'acquisition d'une association odeur-récompense alimentaire ainsi que sa mémorisation quelques jours ou quelques semaines après acquisition. Cependant, un tel apprentissage s'étendrait sur une période longue et ne pourrait se faire avant le sevrage, ce qui implique de définir l'alimentation post-sevrage à donner aux différents groupes de petits.

Nous avons déjà discuté de l'implication de la valeur hédonique du PEA dans le test au sein du pléthysmographe. Si le degré d'hédonicité ne nous semble pas mis en jeu dans la différence de comportement de flairage observé, la nouveauté du stimulus est primordiale pour conclure quant à une baisse de détection du PEA chez les petits HFHS. Si les petits des différents groupes ont été exposés de manière différente à l'odeur du PEA en amont du test comportemental, les phénomènes de mémoire olfactive seraient de nouveau impliqués. Il s'avère que le PEA est contenu dans de nombreuses céréales et représente un constituant des matrices alimentaires. La molécule odorante est donc susceptible d'être présente dans les croquettes données aux mères, qui se retrouvera éventuellement si elle est ingérée dans le liquide amniotique et le lait maternel, et donc dans l'environnement odorant périnatal des petits. Des analyses sont en cours pour déterminer si le PEA est présent ou non dans les deux types de croquettes et dans les laits maternels, et si oui en quelle quantité.

Enfin, les processus d'attention, d'éveil sensoriel et d'intérêt général pour les odeurs entrent en jeu dans les tests comportementaux mis en œuvre. Pour le test de nourriture enfouie, l'attention sensorielle est stimulée par le contexte de recherche de nourriture imposé par la mise à jeun de 5h. Pour le comportement de flairage induit par l'odeur de PEA, le test repose sur la curiosité naturelle des rongeurs à explorer les nouveaux stimuli. Les phénomènes d'attention et d'éveil sont difficiles à évaluer en soi au niveau comportemental. Il serait intéressant d'étudier l'activité des structures cérébrales impliquées dans ces processus au cours d'une tâche olfactive.

Quels mécanismes peuvent relier l'alimentation maternelle HFHS aux déficits olfactifs des petits ? Nous proposons deux hypothèses principales, l'une impliquant les hormones du métabolisme et l'autre impliquant les différentes classes d'acides gras, avant d'évoquer deux hypothèses supplémentaires.

## II. Implication des hormones métaboliques dans les déficits olfactifs

### 1. Causes des perturbations métaboliques

Nos protocoles d'alimentation maternelle HFHS induisent un surpoids et un excès de masse grasse chez la progéniture mâle au sevrage, phénomène souvent rapporté dans la littérature (Ribaroff et al. 2017). Ce déséquilibre de la balance énergétique peut provenir de plusieurs phénomènes non exclusifs les uns des autres.

- Comme le poids de naissance n'était pas affecté par l'alimentation maternelle HFHS, la première hypothèse est celle d'un apport énergétique global plus important au cours de la lactation. Cependant, le volume de lait consommé par les petits en milieu de lactation et la teneur en lipides, protéines et lactose du lait maternel étaient similaires au sein des trois groupes. Le surpoids des petits n'était observé qu'à partir de PND 15 et les petits HFHS peuvent avoir commencé leur alimentation solide autonome plus tôt que les petits CTRL (Kojima et al. 2016), leur apportant ainsi une source supplémentaire d'apports énergétiques riches en lipides et en sucrose.

- La deuxième hypothèse repose sur une dépense énergétique plus faible des petits au cours de la lactation. Nous n'avons pas investigué ce paramètre, et une étude menée en 2012 révèle le phénomène inverse : les petits nés d'une mère exposée à l'aliment HFHS présentaient une dépense énergétique totale plus élevée probablement liée à une oxydation lipidique plus importante (Wahlig et al. 2012).

- Selon une troisième hypothèse, les altérations métaboliques de la mère et/ou son alimentation HFHS prédisposeraient les petits à stocker plus facilement les graisses, à travers par exemple une adaptation des adipocytes, et des modifications dans les mécanismes de stockage et de prise en charge des lipides.

Contrairement à l'alimentation standard, l'alimentation HFHS fournit un apport conséquent en sucrose, clivé en fructose et glucose dans l'intestin. Après absorption intestinale du

glucose, une hyperglycémie transitoire chez la mère apparaît, et le pic glycémique est encore plus important chez les femelles HFHS 8w + gest-lact car elles sont intolérantes au glucose avant la gestation. Le glucose peut traverser la barrière placentaire, qui peut alors entrer dans la circulation fœtale (Oken & Gillman 2003). Le pancréas fœtal va alors compenser en produisant plus d'insuline, qui est une hormone de stockage favorisant entre autres l'absorption du glucose et son stockage sous forme de triglycérides au sein du tissu adipeux. De plus, l'alimentation maternelle peut impacter les marques épigénétiques chez le fœtus et modifier l'expression des gènes impliqués dans le métabolisme lipidique. Il a été montré qu'une alimentation maternelle HFHS était liée à une augmentation de la taille des adipocytes chez la progéniture adulte, et associée à une augmentation des teneurs en ARNm codant pour des acteurs impliqués dans l'adipogenèse et la synthèse des acides gras (FAS (*Fatty Acid Synthase*), PPAR $\alpha$  (*Peroxisome Proliferator-Activated Receptor*) et adiponectine), due à une réduction dans la méthylation de leurs gènes au sein du tissu adipeux (Jiao et al. 2016). La méthylation des gènes impliqués dans le métabolisme lipidique hépatique étaient également modifiée dans le foie (Yu et al. 2015).

Ces trois hypothèses peuvent conduire à des perturbations métaboliques chez la progéniture, caractérisées dans notre protocole d'alimentation maternelle HFHS par un tissu adipeux épидидymaire et des taux de leptine circulante environ deux fois plus importants que chez la progéniture CTRL.

## 2. Les perturbations métaboliques au sevrage peuvent affecter le fonctionnement du système olfactif

De nombreuses études démontrent l'influence métabolique sur la physiologie olfactive (*voir partie 3 des données bibliographiques*).

La leptine est l'une des hormones métaboliques dont l'action sur le système olfactif a été beaucoup investiguée. Au niveau comportemental, des injections ICV de leptine diminuent les capacités de détection odorante chez le rat (Julliard et al. 2007). De plus, les modèles DIO montrant des déficits olfactifs dans la détection et la discrimination odorantes présentent également une hyperleptinémie (Tucker et al. 2012a; Thiebaud et al. 2014). Ainsi dans notre modèle, la leptine pourrait être l'une des causes de la baisse de perception olfactive chez les petits HFHS, et est susceptible d'agir à plusieurs niveaux du système olfactif.

- La leptine peut tout d'abord moduler l'activité de l'EO, puisqu'il a été montré en EOG et en patch-clamp sur neurones individuels que la leptine augmente l'activité spontanée des OSNs mais réduit leur réponse odorante (Lacroix et al. 2008; Savigner et al. 2009). Dans le modèle DIO de Thiebaud et collaborateurs (Thiebaud et al. 2014), une diminution de la réponse EOG de l'EO principal suite à des stimulations odorantes avec des concentrations croissantes d'ACE est observée chez les souris hyperleptinémiques. Chez nos petits HFHS, le récepteur à la leptine était bien exprimé dans l'EO, et les taux d'ARNm étaient diminués dans le groupe HFHS 8w + gest-lact seulement. Comme nous avons révélé des différences dans les réponses EOG au niveau de l'OS mais pas de l'EO principal, les OSNs pourraient être modulés en fonction du type de RO qu'ils expriment. Les OSNs affectés, dispersés au sein de l'EO, produiraient une réponse électrique en partie masquée par celle des OSNs non affectés et très présents au niveau des sites d'enregistrement des EOG. En revanche, les OSNs affectés au sein de l'OS seraient concentrés dans une zone restreinte, et leur réponse serait alors prépondérante par rapport aux autres OSNs non affectés de l'OS. Pour investiguer cet aspect fonctionnel des OSNs, il serait intéressant de réaliser des enregistrements en patch-clamp de l'activité électrique et de la réponse odorante d'OSNs exprimant plusieurs types de RO.

- Les récepteurs à la leptine sont également présents au niveau du BO (Prud'homme et al. 2009; Shioda et al. 1998), où cette hormone peut exercer son action. Le modèle DIO hyperleptinémique ne modifie pas le nombre global de glomérules au sein du BO (Thiebaud et al. 2014), mais présente une activation réduite des JG associées au glomérule M72 latéral suite à une exposition odorante au tiglato d'isopropyle, ligand préférentiel du RO M72 (Fardone et al. 2018). Nous pourrions également investiguer l'activation des neurones du BO suite à une exposition odorante au PEA ou à l'odeur de céréale Crunch dans notre modèle, par marquage c-Fos par exemple. De manière plus générale, une caractérisation plus poussée du fonctionnement du BO est nécessaire, concernant notamment l'activité électrique des cellules mitrales (qui peut être enregistrée en patch-clamp sur tranches de BO) (Fadool et al. 2011) et les oscillations rythmiques (pouvant être évaluées par enregistrements de potentiels de champ) (Chelminski et al. 2017).

- Enfin, la leptine peut agir dans de nombreuses structures olfactives supérieures qui expriment le récepteur à la leptine (Elmqvist et al. 1998; Shioda et al. 1998). Compte tenu de l'implication potentielle des aptitudes mnésiques des souriceaux lors des tests comportementaux olfactifs, nous envisageons d'étudier l'activation (par marquage c-Fos) de

l'hippocampe, structure clef de la mise en mémoire ; de l'amygdale, jouant un rôle dans les processus mnésiques dépendants des émotions ; et de l'hypothalamus latéral, impliqué dans les phénomènes d'éveil et d'attention, suite à une exposition odorante (PEA et céréale Crunch). De nouveau, une étude électrophysiologique en patch-clamp sur tranches nous permettrait de mieux caractériser l'activité neuronale de ces différentes structures.

La leptine n'est pas la seule hormone métabolique capable de moduler le fonctionnement du système olfactif. Les modèles DIO ne sont d'ailleurs pas uniquement hyperleptinémiques, ils présentent aussi une hyperinsulinémie et une intolérance au glucose, tout comme le modèle de souris rendues diabétiques par exposition à une alimentation riche en fructose (Rivière et al. 2016).

L'injection ICV d'insuline provoque chez le rat une baisse de détection odorante et une diminution du flairage induit par une odeur de nourriture (Aimé et al. 2012). L'insuline est également capable de moduler l'activité électro-physiologique des OSNs (Savigner et al. 2009) et des cellules mitrales (Fadool et al. 2011). Cependant, dans notre modèle, les petits HFHS ne sont ni hyperglycémiques ni intolérants au glucose, ce qui ne suggère pas d'hyperinsulinémie. Des dosages d'insuline circulante sont nécessaires pour le confirmer.

En revanche, les taux d'adiponectine sont susceptibles d'être diminués chez les petits HFHS, car bien que produite par le tissu adipeux, elle est sécrétée lorsque les réserves lipidiques diminuent. Les récepteurs à l'adiponectine sont présents au niveau des OSNs (Hass et al. 2008). L'administration intranasale d'adiponectine augmente la réponse odorante des OSNs en EOG, ainsi que l'activation des JG associées au glomérule mOR256-17 au sein du BO (Loch et al. 2013). Ainsi, en parallèle avec l'étude des effets de la leptine au sein du BO, la production d'adiponectine et sa signalisation peuvent constituer des pistes d'investigation.

La leptine et l'adiponectine constituent ainsi les principales cibles potentiellement impliquées dans les déficits olfactifs des petits nés d'une mère exposée à l'alimentation maternelle HFHS. Néanmoins, d'autres peptides non étudiés dans notre présent modèle, comme la ghréline, les orexines, le NPY, les endocannabinoïdes, les opioïdes endogènes et la CCK, peuvent jouer un rôle dans la modulation métabolique du système olfactif.

### 3. Les perturbations métaboliques périnatales peuvent affecter le développement du système olfactif

#### *a) Développement in utéro*

- Nous avons déjà mentionné la possibilité d'une production accrue d'insuline fœtale suite à un environnement placentaire riche en glucose dans les groupes HFHS. Or l'insuline constitue également un facteur de croissance neuronal, impliqué notamment dans la mise en place des circuits neuronaux hypothalamiques (Simerly 2008), et donc susceptible d'impacter le développement de tout système neuronal. Au sein du système olfactif, l'insuline est connue pour son rôle anti-apoptotique au sein de l'EO (Lacroix et al. 2011) et pourrait moduler les dynamiques cellulaires au cours de la mise en place de l'EO.

- En milieu de gestation, une forte augmentation des taux de leptine plasmatique chez la mère est observée (Gavrilova et al. 1997). Cette hyperleptinémie, maximale en fin de gestation, s'accompagne d'un état de résistance à la leptine chez la mère, nécessaire pour assurer les besoins nutritionnels du fœtus qui deviennent de plus en plus intenses. Les taux de leptine maternelle et fœtale sont corrélés (Luo et al. 2013), et les formes courtes et longues du récepteur à la leptine sont présentes dans le placenta (Hoggard et al. 1997) et dans le cerveau fœtal dès E10.5 (Hoggard et al. 1997; Udagawa et al. 2000). Or les taux de leptine fœtale sont critiques dans la régulation du développement des circuits neuronaux de l'hypothalamus (Simerly 2008), et dans la croissance des fibres cholinergiques parasympathiques innervant les cellules  $\beta$  du pancréas (Croizier et al. 2016). La leptine constitue en effet un facteur neurotrophique qui favorise la neurogenèse, la croissance axonale, la plasticité synaptique et la morphologie dendritique (Bouret 2010b).

Dans le modèle DIO de Thiebaud et collaborateurs, le nombre d'OSNs exprimant le RO M72 était diminué au sein de l'EO, entraînant une forte diminution des projections axonales innervant le glomérule M72 au sein du BO chez les souris adultes hyperleptinémiques (Thiebaud et al. 2014). Le turnover au sein de l'EO était également augmenté, avec une prolifération et une apoptose plus importante. Dans ce modèle, on peut supposer que l'hyperleptinémie est associée à une inhibition chronique de l'activité des OSNs, et que les neurones peu actifs sont constamment éliminés pour être renouvelés, d'où un nombre total d'OSNs matures plus faible et des projections axonales vers le BO diminuées.

Dans notre modèle, la leptine fœtale pourrait également avoir impacté la formation des projections axonales entre les OSNs et le BO, en particulier les projections innervant les

glomérules septaux. Chez nos souris transgéniques exprimant la GFP spécifiquement dans les OSNs exprimant SR1, les projections de l'OS vers le BO sont aisément visualisables. La connexion des neurones-relais du BO avec le cortex olfactif, l'innervation des différentes structures centrales olfactives entre elles et les projections centrifuges sur le BO sont tout aussi susceptibles d'avoir été impactées par les taux de leptine foétale. Enfin, il a été montré une implication de la leptine et de l'adiponectine dans les phénomènes inflammatoires, en augmentant la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires (Lappas et al. 2005), pouvant ainsi indirectement influencer le développement cérébral. Ces phénomènes inflammatoires ont d'ailleurs été rapportés au sein de l'EO des souris du modèle DIO (Thiebaud et al. 2014).

### *b) Développement postnatal*

Chez le rongeur, un pic de leptine plasmatique indépendant de la masse grasse est observé entre PND 7 et 10 (Ahima et al. 1998). Cette hyperleptinémie transitoire joue un rôle important pour le développement de la neuro-circuiterie hypothalamique (Djiane & Attig 2008; Bouret 2010a). Une alimentation maternelle HFHS entraîne une hyperleptinémie néonatale plus importante et qui se prolonge jusqu'en fin de lactation (Masuyama & Hiramatsu 2014), comme nous avons pu le mesurer chez les petits HFHS. Ce pic plus soutenu de leptine peut provenir d'une production accrue au sein du tissu adipeux des petits, mais également d'un transfert depuis la mère à travers le lait maternel (Sun et al. 2012). Le système olfactif n'est pas complètement mature à la naissance, et les GC se forment en particulier exclusivement pendant la période postnatale (Hinds 1968). La leptine pourrait donc être impliquée dans les modifications morphologiques des GC de notre modèle, et pourrait éventuellement impacter aussi la densité des épines dendritiques.

## **III. Implication des différents acides gras dans les déficits olfactifs**

*In utero*, les petits HFHS sont exposés à différents AG compte tenu de la composition lipidique des régimes utilisés, qui impacte également la composition lipidique du lait maternel.

Les lipides sont des constituants essentiels des membranes plasmiques, impliqués dans l'architecture membranaire (Dowhan & Bogdanov 2002), et jouent également le rôle de

molécules de signalisation (Wymann & Schneider 2008). Une exposition périnatale différente aux AG, notamment les AGPI n-3 et n-6, peut ainsi impacter le fonctionnement neuronal.

### 1. Acides gras et fonctionnement du système olfactif

Il a été montré qu'une alimentation riche en AGPI n-3 diminue l'inflammation et améliore les fonctions neuronales. Les AGPI n-3 permettraient de réduire la production des facteurs pro-inflammatoires comme IL-6 et TNF $\alpha$  dans la microglie (Lu et al. 2010) et d'améliorer la signalisation de la sérotonine en augmentant sa libération par les neurones présynaptiques, la fluidité membranaire des neurones postsynaptiques, et la disponibilité du récepteur à la sérotonine (Patrick & Ames 2015).

Dans le projet n-3, nous n'avons pas montré d'amélioration des fonctions olfactives chez les petits du groupe ENR par rapport aux petits du groupe EQU. Cependant, nous avons révélé une baisse de la perception olfactive dans le groupe DEF, similaire à celle observée dans les groupes HFHS. Le régime DEF n'était ni hyperlipidique, ni hypercalorique, mais ne contenait presque pas d'AGPI n-3.

Une plus faible disponibilité en AGPI n-3 dans les groupes DEF et HFHS pourrait entraîner un état inflammatoire plus important à l'origine des déficits olfactifs observés.

L'alimentation maternelle pauvre en AGPI n-3 peut impacter sur le système olfactif de la progéniture à travers des processus inflammatoires, mais aussi directement en modifiant la composition lipidique des membranes neuronales.

Incorporé dans la membrane plasmique, l'acide docosahexaénoïque (DHA, C22:6 n-3) est impliqué dans la composition des rafts lipidiques membranaires, qui sont des régions de la membrane plasmique servant de plateforme de signalisation (Shaikh et al. 2009). Ainsi, le DHA peut moduler l'activité de protéines membranaires clés pour le fonctionnement neuronal. En particulier en ce qui concerne le système olfactif, le DHA influence l'activité de divers RCPG (Gawrisch et al. 2008; Mitchell et al. 2003) et des canaux voltage-dépendants à K<sup>+</sup> et Na<sup>+</sup> (Seebungkert & Lynch 2002).

Le DHA est le principal AGPI n-3 retrouvé dans le cerveau et dans l'EO (Le Bon et al. 2018) et chez le rongeur, une déficience en DHA perturbe la mémoire olfactive (Catalan et al. 2002; Greiner et al. 1999) et la discrimination des odeurs (Greiner et al. 2001; Hichami et al.

2007). Cette baisse de performance olfactive était associée à une diminution de l'expression de c-Fos dans le BO (Hichami et al. 2007).

Le DHA n'est pas du tout présent dans les régimes HFHS et DEF, et très faiblement présent dans les laits des mères exposées à ces régimes. Chez les petits issus de ces mères, le DHA est donc principalement produit au sein des tissus à partir de son précurseur, l'acide  $\alpha$ -linoléique (C18:3 n-3). Ce dernier se retrouve également en quantités moins importantes dans les régimes HFHS et DEF que dans les régimes standards associés. Une évaluation des teneurs en DHA au sein des neurones du système olfactif des différentes progénitures permettrait de déterminer si les déficits olfactifs observés proviennent d'une différence de composition lipidique membranaire ou non.

## 2. Acides gras et développement du système olfactif

Dans le cerveau, le DHA peut moduler la signalisation neuronale (Kim & Edsall 1999), inhiber l'apoptose des neurones (Kim et al. 2000) et promouvoir l'action des facteurs de croissance neuronaux (Ikemoto et al. 2000).

Ainsi, un plus faible apport en DHA au moment des périodes de développement du système olfactif pourrait altérer la mise en place des circuits neuronaux olfactifs et contribuer aux perturbations comportementales mises en évidence lors des tests olfactifs sur la progéniture au sevrage.

Les deux hypothèses avancées, l'une impliquant les hormones métaboliques et l'autre reposant sur la qualité des AG, peuvent expliquer l'origine des altérations olfactives de la progéniture. Tout au long de nos expérimentations, nous avons révélé des résultats comparables pour les groupes HFHS gest-lact et HFHS 8w + gest-lact. Le statut métabolique de la mère avant la gestation semble donc moins important que son alimentation pendant les périodes de développement en ce qui concerne le bon développement du système olfactif. D'autres groupes expérimentaux sont nécessaires pour étayer cette hypothèse, avec induction d'un état métabolique pré-gestationnel plus altéré (obésité maternelle, diabète), combiné à une alimentation SD ou HFHS pendant la gestation et la lactation. Il serait également intéressant d'étudier les effets de l'alimentation maternelle HFHS pendant la gestation et la lactation de manière séparée, en changeant le régime après la mise bas ou en réalisant des adoptions croisées.

A ces deux hypothèses s'ajoutent également deux autres phénomènes qui auraient pu contribuer aux perturbations olfactives des petits dans nos protocoles expérimentaux.

#### IV. L'exposition odorante précoce

L'alimentation des mères gestantes et allaitantes influence leur odeur corporelle et celle du lait maternel produit, créant ainsi une exposition odorante périnatale différente chez les petits selon que leur mère ait reçu l'aliment SD ou HFHS.

Les fluides biologiques de la mère (liquide amniotique, lait, salive), contiennent des odeurs provenant de son alimentation et de son environnement. Les odeurs présentes *in utero* et dans le lait maternel peuvent induire des préférences envers ces odeurs chez l'homme (Marlier et al. 1998; Schaal et al. 2000) et le rongeur (Coureaud et al. 2002; Todrank et al. 2011), qui peuvent être associées à des modifications neuro-anatomiques au sein du système olfactif. Chez le rongeur, l'exposition sensorielle précoce par ajout d'une odeur dans la cage d'élevage peut en effet altérer la formation de la circuiterie du système olfactif. Au sein de l'EO, l'exposition postnatale à un odorant particulier a induit une diminution de la densité des OSNs exprimant l'un des RO activés par cet odorant (Cadiou et al. 2014). Dans le BO, l'exposition odorante postnatale modifie l'intensité de l'activité neuronale (Carmi & Leon 1991; Rosselli-Austin & Williams 1990; Wilson et al. 1985; Woo & Leon 1987) et peut affecter le nombre ou la taille des glomérules au sevrage (Todrank et al. 2011; Valle-Leija et al. 2012). L'ajout d'une exposition odorante prénatale exacerbe ce remodelage neuro-anatomique du BO (Todrank et al. 2011).

Récemment, il a été montré qu'une exposition odorante périnatale, en ajoutant un odorant dans l'alimentation maternelle pendant la gestation et la lactation, induisait chez la progéniture une baisse d'activité électrophysiologique de l'EO en EOG en réponse à l'odorant ajouté dans l'alimentation maternelle, une diminution du nombre de glomérules associés à cet odorant, et modifiait le taux de transcription des gènes impliqués dans la cascade de transduction olfactive (Dewaele et al. 2018). Ces perturbations neuro-anatomiques étaient associées à une modification des préférences odorantes chez la progéniture à 2 et 3 semaines de vie. En revanche, dans le modèle DIO de Thiebaud et collaborateurs, les auteurs ont montré que la perte d'OSNs induite par l'alimentation HF n'était pas reproduite en exposant les animaux à l'odeur de l'alimentation HF tout en les nourrissant avec une alimentation SD (Thiebaud et al. 2014). D'autre part, les individus sous HFHS et SD étaient

hébergés dans des cages voisines et très peu espacées. Ainsi, les individus des différents groupes étaient en contact avec les odeurs des deux aliments. Pour vérifier l'ampleur de l'exposition odorante précoce dans nos protocoles de mise sous alimentation maternelle, une analyse des odorants au sein des deux types de régimes et dans les laits maternels des femelles des différents groupes est en cours.

## V. Alimentation maternelle, stress et olfaction

Il est maintenant établi que l'alimentation maternelle HFHS et l'obésité maternelle constituent des facteurs de risques de développer des désordres neuropsychiatriques tels que l'anxiété et la dépression chez la progéniture (Rivera et al. 2015; Sullivan et al. 2014, 2015). Chez le rongeur, des comportements anxieux chez l'individu adulte et l'adolescent sont également induits suite à une alimentation maternelle HFHS en période périnatale, l'implication des glucocorticoïdes dans ce processus est proposée (Sasaki et al. 2013; Sasaki et al. 2014).

Par ailleurs, les modèles de stress chez le rongeur sont associés à des déficits olfactifs. Des rats soumis à un stress chronique variable, par des traitements quotidiens comprenant la mise en obscurité ou sous lumière vive, l'isolement, la contention, la mise à jeun, l'exposition à différentes températures, présentaient une réponse électrophysiologique de l'EO en EOG modifiée associée à une augmentation dans l'expression de marqueurs apoptotiques au sein de l'EO (Raynaud et al. 2015). Chez des souris gestantes soumises à une contention quotidienne sous lumière vive, une altération du comportement maternel a été observée et attribuée à une plus grande difficulté des mères stressées à reconnaître l'odeur de leurs petits (Belnoue et al. 2016). Cette perturbation de mémorisation odorante était liée à une absence de remodelage dendritique au sein du BO. Enfin, dans un modèle de stress chez la souris par injection de corticostérone, une altération des capacités de discrimination fine et de mémoire olfactive a été mise en évidence et était associée à une perturbation de la neurogenèse bulbaire (Siopi et al. 2016).

Nous n'avons pas mis en évidence de différence de comportement chez les petits HFHS lors d'une session comportementale libre de 10 min (Figure 26). Cependant, des tests spécifiques comme la nage forcée, la suspension par la queue, le labyrinthe élevé ou encore l'open-field, nous permettrait d'investiguer plus en détail le comportement anxieux ou dépressif des petits soumis aux protocoles expérimentaux de cette étude.

Conclusion  
et  
Perspectives

Ce projet de thèse a permis de mettre en lumière un effet de l'alimentation maternelle HFHS sur les capacités olfactives des petits dans un modèle murin. Chez la progéniture HFHS, des modulations du traitement de l'information olfactive ont été observées dans une région restreinte de l'EO seulement, ainsi que des modifications morphologiques des interneurons dans le BO. Les mesures d'activation des neurones du cortex piriforme effectuées n'ont pas montré d'impact du régime maternel HFHS.

De nombreuses perspectives s'offrent à nous pour compléter ces travaux de thèse. Il est tout d'abord nécessaire d'investiguer plus en détails le traitement central du signal olfactif chez les petits HFHS, pour identifier précisément les altérations anatomiques et fonctionnelles qui sous-tendent leur comportement olfactif perturbé. Ainsi, il sera plus aisé de cibler l'hypothèse mécanistique à l'origine du lien entre l'alimentation maternelle HFHS et l'impact sur l'olfaction de la progéniture. Ensuite, une multitude de protocoles expérimentaux variables dans les compositions des aliments utilisés (proportions et composition détaillée en lipides, glucides, protéines, micronutriments) et dans les durées d'exposition aux aliments (plusieurs mois avant la gestation, pendant la gestation ou la lactation uniquement) peuvent être mis en place afin de déterminer si certains éléments de l'alimentation maternelle jouent un rôle plus important dans la susceptibilité de la progéniture à développer des déficits olfactifs et dans cette vulnérabilité, et s'il existe des périodes plus critiques pour cette vulnérabilité. Enfin, il serait intéressant d'identifier les éventuelles conséquences à long terme des déficits olfactifs observés au moment du sevrage, en termes d'interactions sociales, d'évitement des dangers et de comportement alimentaire. L'évaluation des capacités olfactives chez la progéniture adulte permettrait également de savoir si les perturbations des capacités olfactives du jeune individu persistent à l'âge adulte, et si éventuellement elles peuvent être rétablies par une meilleure alimentation, une restriction calorique, de l'exercice physique ou encore une exposition odorante.

Dans le cadre de la lutte contre le surpoids et l'obésité, les méthodes préventives sont essentielles afin de réduire ces fléaux de manière durable au sein de la population mondiale. Depuis le lancement du programme national nutrition santé (PNNS) en 2001, les campagnes de sensibilisation sur les effets néfastes d'une alimentation riche en graisses et en sucres se sont multipliées. Cependant, les messages de santé publique concernant les risques d'une telle alimentation chez les femmes en âge de procréer, les femmes enceintes et les femmes allaitantes, sur la santé de leur descendance, se font plus rares.

Ces travaux s'inscrivent donc dans une volonté d'accroître les connaissances sur la thématique de l'alimentation maternelle et de son impact sur la santé de la descendance, dans le but de prévenir les comportements alimentaires qui nuiraient au bon développement des générations futures. La littérature scientifique démontre en effet un lien entre l'alimentation de la mère pendant les périodes de développement et la vulnérabilité du futur individu face aux pathologies métaboliques, cardiovasculaires et cérébrales. L'impact sur les systèmes sensoriels reste quant à lui peu exploré, malgré l'importance reconnue de l'odorat pour les comportements quotidiens et vitaux tels que s'alimenter et éviter des dangers.

# Références bibliographiques

---

- Ache, B. W., & Young, J. M. (2005). Olfaction: diverse species, conserved principles. *Neuron*, 48(3), 417–430.
- Adamek, G. D., Gesteland, R. C., Mair, R. G., & Oakley, B. (1984). Transduction physiology of olfactory receptor cilia. *Brain Research*, 310(1), 87–97.
- Ahima, R. S., & Lazar, M. A. (2008). Adipokines and the peripheral and neural control of energy balance. *Molecular Endocrinology*, 22(5), 1023–1031.
- Ahima, R. S., Prabakaran, D., & Flier, J. S. (1998). Postnatal leptin surge and regulation of circadian rhythm of leptin by feeding. Implications for energy homeostasis and neuroendocrine function. *Journal of Clinical Investigation*, 101(5), 1020–1027.
- 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.
- Aimé, P., Hegoburu, C., Jaillard, T., Degletagne, C., Garcia, S., Messaoudi, B., Romestaing, C. & 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), 1–13.
- Aimé, P., Palouzier-Paulignan, B., Salem, R., Al Koborssy, D., Garcia, S., Duchamp, C., ... Julliard, A. K. (2014). Modulation of olfactory sensitivity and glucose-sensing by the feeding state in obese Zucker rats. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 8(September), 326.
- Al Koborssy, D., Palouzier-Paulignan, B., Salem, R., Thevenet, M., Romestaing, C., & Julliard, A. K. (2014). Cellular and molecular cues of glucose sensing in the rat olfactory bulb. *Frontiers in Neuroscience*, 8(October), 333.
- Albrecht, J., Schreder, T., Kleemann, A. M., Schopf, V., Anzinger, A., Demmel, M., ... Wiesmann, M. (2009). Olfactory detection thresholds of food and non-food odors in hunger and satiety. *Rhinology*, 47(2)(15), 160–165.
- Andersen, R. E. (2000). The spread of the childhood obesity epidemic. *Canadian Medical Association Journal*, 163(11), 1461–1462.
- ANSES. (2003). Acide gras de la famille oméga 3 et système cardiovasculaire: intérêt nutritionnel et allégations. Rapport de l'Anses, 1–104.
- ANSES. (2017). Étude Individuelle Nationale des Consommations Alimentaires 3 (INCA 3).
- Aoudé, I. (2012). Effets de l'environnement sur la plasticité des neurones olfactifs durant le développement: étude anatomique, moléculaire, physiologique et comportementale. (Thèse)
- 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.
- Apelbaum, A. F., Perrut, A., & Chaput, M. (2005). Orexin A effects on the olfactory bulb spontaneous activity and odor responsiveness in freely breathing rats. *Regulatory Peptides*, 129(1–3), 49–61.
- Aroniadou-Anderjaska, V., Zhou, F. M., Priest, C. A., Ennis, M., & Shipley, M. T. (2000). Tonic and synaptically evoked presynaptic inhibition of sensory input to the rat olfactory bulb via GABA (B) heteroreceptors. *Journal of Neurophysiology*, 84(3), 1194–1203.
- Aschenbrenner, K., Hummel, C., Teszmer, K., Krone, F., Ishimaru, T., Seo, H.-S., & Hummel, T. (2008). The influence of olfactory loss on dietary behaviors. *The Laryngoscope*, 118(1), 135–44.
- Astic, L., Saucier, D., Coulon, P., Lafay, F., & Flamand, A. (1993). The CVS strain of rabies virus as

- transneuronal tracer in the olfactory system of mice. *Brain Research*, 619(1–2), 146–156.
- Aungst, J. L., Heyward, P. M., Puche, A. C., Karnup, S. V., Hayar, A., Szabo, G., & Shipley, M. T. (2003). Centre – surround inhibition among olfactory bulb glomeruli. *Nature*, 426(December), 623–629.
- Bailey, C. H., & Kandel, E. R. (1993). Structural changes accompanying memory storage. *Annual Review of Physiology*, 55(1), 397–426.
- Bakalyar, H. A., & Reed, R. R. (1990). Identification of a specialized adenylyl cyclase that may mediate odorant detection. *Science*, 250(4986), 1403–6.
- Baly, C., Aioun, J., Badonnel, K., Lacroix, M. C., Durieux, D., Schlegel, C., ... Caillol, M. (2007). Leptin and its receptors are present in the rat olfactory mucosa and modulated by the nutritional status. *Brain Research*, 1129(1), 130–141.
- Barker, D. (1990). The fetal and infant origins of adult disease. *BMJ: British Medical Journal*, 301(156), 1111.
- Barnea, G., O'Donnell, S., F. M., Sun, X., Nemes, A., Mendelsohn, M., & Axel, R. (2004). Odorant receptors on axon termini in the brain. *Science Translational Medicine*, 304(June), 1468.
- Barnes, D. C., Hofacer, R. D., Zaman, A. R., Rennaker, R. L., & Wilson, D. A. (2008). Olfactory perceptual stability and discrimination. *Nature Neuroscience*, 11(12), 1378–1380.
- Barnes, S. K., & Ozanne, S. E. (2011). Pathways linking the early environment to long-term health and lifespan. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 106(1), 323–336.
- Baskin, D. G., Porte, D., Guest, K., & Dorsa, D. M. (1983). Regional concentrations of insulin in the rat brain. *Endocrinology*, 112(3), 898–903.
- Bathellier, B., Lagier, S., Faure, P., & Lledo, P. (2006). Circuit properties generating gamma oscillations in a network model of the olfactory bulb. *Journal of Neurophysiology*, 95, 2678–2691.
- Bayol, S. A., Farrington, S. J., & Stickland, N. C. (2007). A maternal “junk food” diet in pregnancy and lactation promotes an exacerbated taste for “junk food” and a greater propensity for obesity in rat offspring. *The British Journal of Nutrition*, 98(4), 843–851.
- Beinfeld, M. C., Meyer, D. K., Eskay, R. L., Jensen, R. T., & Brownstein, M. J. (1981). The distribution of cholecystokinin immunoreactivity in the central nervous system of the rat as determined by radioimmunoassay. *Brain Research*, 212(1), 51–57.
- Bellisario, V., Panetta, P., Balsevich, G., Baumann, V., Noble, J., Raggi, C., ... Cirulli, F. (2015). Maternal high-fat diet acts as a stressor increasing maternal glucocorticoids' signaling to the fetus and disrupting maternal behavior and brain activation in C57BL/6J mice. *Psychoneuroendocrinology*, 60, 138–150.
- Belluscio, L., & Katz, L. C. (2001). Symmetry, stereotypy, and topography of odorant representations in mouse olfactory bulbs. *The Journal of Neuroscience*, 21(6), 2113–2122.
- Belnoue, L., Grosjean, N., Abrous, D. N., & Koehl, M. (2011). A critical time window for the recruitment of bulbar newborn neurons by olfactory discrimination learning. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 31(3), 1010–1016.
- Belnoue, L., Malvaut, S., Ladevèze, E., & Abrous, D. N. (2016). Plasticity in the olfactory bulb of the maternal mouse is prevented by gestational stress. *Nature Publishing Group*, (November), 1–11.
- Bensafi, M., Sobel, N., & Khan, R. M. (2007). Hedonic-specific activity in piriform cortex during odor imagery mimics that during odor perception. *Journal of Neurophysiology*, 98(6), 3254–3262.
- Berkowicz, D. A., Trombley, P. Q., & Shepherd, G. M. (1994). Evidence for glutamate as the olfactory receptor cell neurotransmitter. *Journal of Neurophysiology*, 71(6), 2557–2561.
- Bermudez-Rattoni, F., Rusiniak, K. W., & Garcia, J. (1983). Flavor-illness aversions: Potentiation of odor by taste is disrupted by application of novocaine into amygdala. *Behavioral and Neural*

- Biology, 37(1), 61–75.
- Berridge, K. C. (1996). Food reward : brain structures of wanting and liking. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 20(1), 1–25.
- Bilbo, S. D., & Tsang, V. (2010). Enduring consequences of maternal obesity for brain inflammation and behavior of offspring. *The FASEB Journal*, 24(6), 2104–2115.
- Bilkó, Á., Altbäcker, V., & Hudson, R. (1994). Transmission of food preference in the rabbit: the means of information transfer. *Physiology and Behavior*, 56(5), 907–912.
- Blakemore, L. J., Levenson, C. W., & Trombley, P. Q. (2006). Neuropeptide Y modulates excitatory synaptic transmission in the olfactory bulb. *Neuroscience*, 138(2), 663–674.
- Blass, E. M., & Teicher, M. H. (1980). Suckling. *Science*, 210(4465), 15–22.
- Bleymehl, K., Pérez-Gómez, A., Omura, M., Moreno-Pérez, A., Macías, D., Bai, Z., ... Mombaerts, P. (2016). A sensor for low environmental oxygen in the mouse main olfactory epithelium. *Neuron*, 92(6), 1196–1203.
- Bobkov, Y. V., & Ache, B. W. (2005). Pharmacological properties and functional role of a TRP-related ion channel in lobster olfactory receptor neurons. *Journal of Neurophysiology*, 1372–1380.
- Bodnar, R. J., & Klein, G. E. (2006). Endogenous opiates and behavior:2005. *Peptides*, 27, 3391–3478.
- Bonfils, P., Avan, P., Faulcon, P., & Malinvaud, D. (2005). Distorted odorant perception: Analysis of a series of 56 patients with parosmia. *Archives of Otolaryngology–Head & Neck Surgery*, 131(2), 107–112.
- Borisy, F. F., Ronnett, G. V., Cunningham, A. M., Juilfs, D., Beavo, J., & Snyder, S. H. (1992). Calcium/Calmodulin-activated phosphodiesterase expressed in olfactory receptor neurons. *The Journal of Neuroscience*, 12(3), 915–923.
- Borowsky, B., Adham, N., Jones, K. A., Raddatz, R., Artymyshyn, R., Ogozalek, K. L., ... Gerald, C. (2001). Trace amines: Identification of a family of mammalian G protein-coupled receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(16), 8966–8971.
- Bouret, S. G. (2010a). Development of hypothalamic neural networks controlling appetite. *Forum Nutr*, 63, 84–93.
- Bouret, S. G. (2010b). Neurodevelopmental actions of leptin. *Brain Research*, 1350, 2–9.
- Bowe, J. E., Franklin, Z. J., Hauge-Evans, A. C., King, A. J., Persaud, S. J., & Jones, P. M. (2014). Assessing glucose homeostasis in rodent models. *Journal of Endocrinology*, 222(3), 13–25.
- Bozza, T., Feinstein, P., Zheng, C., & Mombaerts, P. (2002). Odorant receptor expression defines functional units in the mouse olfactory system. *The Journal of Neuroscience*, 22(8), 3033–3043.
- Bray, G. A. (1977). The Zucker-fatty rat: a review. *Federation Proceedings*, 36(2), 148–153.
- Brennan, P. A., & Kendrick, K. M. (2006). Mammalian social odours: Attraction and individual recognition. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 361(1476), 2061–2078.
- Brennan, P. A., & Zufall, F. (2006). Pheromonal communication in vertebrates. *Nature*, 444(7117), 308–315.
- Bressel, O. C., Khan, M., & Mombaerts, P. (2016). Linear correlation between the number of olfactory sensory neurons expressing a given mouse odorant receptor gene and the total volume of the corresponding glomeruli in the olfactory bulb, 209, 199–209.
- Breton-Provencher, V., Lemasson, M., Peralta, M. R., & Saghatelian, A. (2009). Interneurons produced in adulthood are required for the normal functioning of the olfactory bulb network and for the execution of selected olfactory behaviors. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 29(48), 15245–15257.

- Brill, M. S., Ninkovic, J., Winpenny, E., Hodge, R. D., Ozen, I., Yang, R., ... Götz, M. (2009). Adult generation of glutamatergic olfactory bulb interneurons. *Nature Neuroscience*, 12(12), 1524–1533.
- Buck, L. B. (1996). Information coding in the vertebrate olfactory system. *Annual Review of Neuroscience*, 19, 517–544.
- Buck, L. B., & Axel, R. (1991). A novel multigene family may encode odorant receptors: a molecular basis for odor recognition. *Cell*, 65(1), 175–87.
- Buonfiglio, D. C., Ramos-lobo, A. M., Freitas, V. M., Zampieri, T. T., Nagaishi, V. S., Magalhães, M., ... Jr, J. D. (2016). Obesity impairs lactation performance in mice by inducing prolactin resistance. *Nature Publishing Group*, (March), 1–13.
- Buonviso, N., Amat, C., & Litaudon, P. (2006). Respiratory modulation of olfactory neurons in the rodent brain. *Chemical Senses*, 31(2), 145–154.
- Buonviso, N., & Chaput, M. (1999). Olfactory experience decreases responsiveness of the olfactory bulb in the adult rat. *Neuroscience*, 95(2), 325–332.
- Burd, G. D. (1993). Morphological study of the effects of intranasal zinc sulfate irrigation on the mouse olfactory epithelium and olfactory bulb. *Microscopy Research and Technique*, 24(3), 195–213.
- Burdakov, D., Luckman, S. M., & Verkhatsky, A. (2005). Glucose-sensing neurons of the hypothalamus. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 360(1464), 2227–2235.
- Burton, M. J., Rolls, E. T., & Mora, F. (1976). Effects of hunger on the responses of neurons in the lateral hypothalamus to the sight and taste of food. *Experimental Neurology*, 51(3), 668–677.
- Bushdid, C., Magnasco, M. O., Vosshall, L. B., & Keller, A. (2014). Humans can discriminate more than 1 trillion olfactory stimuli. *Science*, 343(6177), 1370–2.
- Cabanac, M. (1971). Physiological Role of Pleasure. *Science*, 173(February 1965), 1103–1107.
- Cadiou, H., Aoudé, I., Tazir, B., Molinas, A., Fenech, C., Meunier, N., & Grosmaître, X. (2014). Postnatal odorant exposure induces peripheral olfactory plasticity at the cellular level. *The Journal of Neuroscience*, 34(14), 4857–70.
- Caillol, M., Aïoun, J., Baly, C., Persuy, M. A., & 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 Research*, 960(1–2), 48–61.
- Capaldi, E. D., Hunter, M. J., & Privitera, G. J. (2004). Odor of taste stimuli in conditioned “taste” aversion learning. *Behavioral Neuroscience*, 118(6), 1400–1408.
- Carmi, O., & Leon, M. (1991). Neurobehavioral responses of neonatal rats to previously experienced odors of different concentrations. *Developmental Brain Research*, 64(1–2), 43–46.
- Castro, F. de, Hu, L., Drabkin, H., Sotelo, C., & Chedotal, A. (1999). Chemoattraction and chemorepulsion of olfactory bulb axons by different secreted semaphorins. *The Journal of Neuroscience*, 19(11), 4428–4436.
- Catalan, J., Toru, M., Slotnick, B., Murthy, M., Greiner, R. S., & Salem Jr., N. (2002). Cognitive deficits in docosahexaenoic acid-deficient rats. *Behavioral Neuroscience*; 116(6).
- Challis, R. C., Tian, H., Wang, J., Huang, L., Zhao, K., Challis, R. C., ... Yin, W. (2015). An olfactory cilia pattern in the mammalian nose ensures high sensitivity to odors. *Current Biology*, 25(19), 1–10.
- Chang, G.-Q., Gaysinskaya, V., Karatayev, O., & Leibowitz, S. F. (2008). Maternal high-fat diet and fetal programming: increased proliferation of hypothalamic peptide-producing neurons that increase risk for overeating and obesity. *Journal of Neuroscience*, 28(46), 12107–12119.

- Chelminski, Y., Magnan, C., Luquet, S. H., Everard, A., Meunier, N., Gurden, H., & Martin, C. (2017). Odor-induced neuronal rhythms in the olfactory bulb are profoundly modified in ob/ob obese mice. *Frontiers in Physiology*, 8(JAN), 1–12.
- Chen, Y., Getchell, M., Ding, X., & Getchell, T. (1992). Immunolocalization of two cytochrome P450 isozymes in rat nasal chemosensory tissue. *Neuroreport*, 3(9), 749–52.
- Chen, Y., Lin, Y., Kuo, T., & Knight, Z. A. (2016). Sensory detection of food rapidly modulates arcuate feeding circuits. *Cell*, 160(5), 829–841.
- Chin, E. H., Schmidt, K. L., Martel, K. M., Wong, C. K., Hamden, E., Gibson, W. T., ... Christians, J. K. (2017). A maternal high-fat high-sucrose diet has sex-specific effects on fetal glucocorticoids with little consequence for offspring metabolism and voluntary locomotor activity in mice. *PLoS ONE*, 12, 1–20.
- Chronwall, B. M., DiMaggio, D. A., Massari, V. J., Pickel, V. M., Ruggiero, D. A., & O'donohue, T. L. (1985). The anatomy of neuropeptide-y-containing neurons in rat brain. *Neuroscience*, 15(4), 1159–1181.
- Cleland, T. A., Johnson, B. A., Leon, M., & Linster, C. (2007). Relational representation in the olfactory system. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(6), 1953–1958.
- Cohen, Y., Reuveni, I., Barkai, E., & Maroun, M. (2008). Olfactory learning-induced long-lasting enhancement of descending and ascending synaptic transmission to the piriform cortex. *Journal of Neuroscience*, 28(26), 6664–6669.
- Contu, L., & Hawkes, C. A. (2017). A review of the impact of maternal obesity on the cognitive function and mental health of the offspring. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(5).
- Corona, R., & Lévy, F. (2015). Chemical olfactory signals and parenthood in mammals. *Hormones and Behavior*, 68, 77–90.
- Costanzo, R. M. (1985). Neural regeneration and functional reconnection following olfactory nerve transection in hamster. *Brain Research*, 361(1–2), 258–266.
- Coureaud, G., Hudson, R., Orgeur, P., & Coudert, P. (2002). Transnatal olfactory continuity in the rabbit: behavioral evidence and short-term consequence of its disruption. *Developmental Psychobiology*, 40, 372–390.
- Coureaud, G., Schaal, B., Langlois, D., & Perrier, G. (2001). Orientation response of newborn rabbits to odours of lactating females: Relative effectiveness of surface and milk cues. *Animal Behaviour*, 61(1), 153–162.
- Croizier, S., Prevot, V., & Bouret, S. G. (2016). Leptin Controls Parasympathetic Wiring of the Pancreas during Embryonic Life. *Cell Reports*, 15(1), 36–44.
- Cummings, D. E. (2001). A preprandial rise in plasma ghrelin levels suggests a role in meal initiation in humans. *Diabetes*, 50(August), 1714–1719.
- Cunningham, A. M., Ryugo, D. K., Sharp, A. H., Reed, R. R., Snyder, S. H., & Ronnett, G. V. (1993). Neuronal inositol 1,4,5-trisphosphate receptor localized to the plasma membrane of olfactory cilia. *Neuroscience*, 57(2), 339–352.
- Cuschieri, A., & Bannister, L. H. (1975). The development of the olfactory mucosa in the mouse: electron microscopy. *Journal of Anatomy*, 119(Pt 3), 471–498.
- Cygnar, K. D., Stephan, A. B., & Zhao, H. (2010). Analyzing responses of mouse olfactory sensory neurons using the air-phase electroolfactogram recording. *Journal of Visualized Experiments*, (37), 1–5.
- Das, U. N. (2001). Is obesity an inflammatory condition? *Nutrition*, 17(11–12), 953–966.
- Date, Y., Kojima, M., Hosoda, H., Sawaguchi, A., Mondal, M. S., Sukanuma, T., ... Nakazato, M. (2011). Ghrelin, a novel growth hormone-releasing acylated peptide, is synthesized in a distinct endocrine cell type in the gastrointestinal tracts of rats and humans. *Endocrinology*, 141(11).

- Datiche, F., Litaudon, P., & Cattarelli, M. (1996). Intrinsic association fiber system of the piriform cortex: A quantitative study based on a cholera toxin B subunit tracing in the rat. *Journal of Comparative Neurology*, 376(2), 265–277.
- Daws, L. C., & Gould, G. G. (2011). Ontogeny and regulation of the serotonin transporter: providing insights into human disorders. *Pharmacology and Therapeutics*, 131(1), 61–79.
- Dawson, T. M., Arriza, J. L., Jaworsky, D. E., Borisy, F. F., Attramadal, H., Lefkowitz, R. J., & Ronnett, G. V. (1993). Beta-Adrenergic Receptor Kinase-2 and Beta-Arrestin-2 as Mediators of Odorant-Induced Desensitization. *Science*, 259, 825–829.
- De Castro, F. (2009). Wiring olfaction: The cellular and molecular mechanisms that guide the development of synaptic connections from the nose to the cortex. *Frontiers in Neuroscience*, 3(DEC), 1–17.
- Decsi, T., & Koletzko, B. (2005). N-3 fatty acids and pregnancy outcomes. *Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care*, 8, 161–166.
- Depeters, E. J., & Hovey, R. C. (2009). Methods for collecting milk from mice. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, 14(4), 397–400.
- Dewaele, A., Persuy, M. A., Badonnel, K., Meunier, N., Durieux, D., Castille, J., ... Baly, C. (2018). Chronic perinatal odour exposure with heptaldehyde affects odour sensitivity and olfactory system homeostasis in preweaning mice. *Behavioural Brain Research*, 347(2010), 414–424.
- Dhallan, R. S., Yau, K. W., Schrader, K. A., & Reed, R. R. (1990). Primary structure and functional expression of a cyclic nucleotide-activated channel from olfactory neurons. *Nature*, 347(6289), 184–187. h
- Djiane, J., & Attig, L. (2008). Role of leptin during perinatal metabolic programming and obesity. *Journal of Physiology and Pharmacology*, 59(SUPPL.1), 55–63.
- Dong, M., Zheng, Q., Ford, S. P., Nathanielsz, P. W., & Ren, J. (2013). Maternal obesity, lipotoxicity and cardiovascular diseases in offspring. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 55(1), 111–116.
- Doucette, R. (1993). Glial cells in the nerve fiber layer of the main olfactory bulb of embryonic and adult mammals. *Microsc Res Tech*, 24(2), 113–130.
- Dowhan, W., & Bogdanov, M. (2002). Functional roles of lipids in membranes. In D.E. Vance and J.E. Vance (Eds.) *Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membrane*, 5th Edition, Elsevier Science, Amsterdam, Netherlands (pp. 1–37).
- 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.
- Drouillet, P., Kaminski, M., De Lauzon-Guillain, B., Forhan, A., Ducimetière, P., Schweitzer, M., ... Charles, M. A. (2009). Association between maternal seafood consumption before pregnancy and fetal growth: Evidence for an association in overweight women. The EDEN mother-child cohort. *Paediatric and Perinatal Epidemiology*, 23(1), 76–86.
- Duchamp-Viret, P., Chaput, M. a., & Duchamp, A. (1999). Odor Response Properties of Rat Olfactory Receptor Neurons. *Science*, 284(5423), 2171–2174.
- Duchamp-Viret, P., Duchamp, A., & Chaput, M. A. (2000). Peripheral odor coding in the rat and frog: quality and intensity specification. *The Journal of Neuroscience*, 20(6), 2383–2390.
- Duclaux, R., Feisthauer, J., & Cabanac, M. (1973). Effets du Repas sur l'Agrément d'odeurs Alimentaires et Nonalimentaires Chez l'Homme. *Physiology and Behavior*, 10(6), 1029–1033.
- Dunn, G. A., & Bale, T. L. (2009). Maternal high-fat diet promotes body length increases and insulin insensitivity in second-generation mice. *Endocrinology*, 150(11), 4999–5009.
- Dupont, A., Mérand, Y., Savard, P., Leblanc, J., & Dockray, G. J. (1982). Evidence that cholecystokinin

- is a neurotransmitter of olfaction in nucleus olfactorius anterior. *Brain Research*, 250(2), 386–390.
- Edlow, A. G. (2017). Maternal obesity and neurodevelopmental and psychiatric disorders in offspring. *Prenatal Diagnosis*, 37(1), 95–110.
- Edlow, A. G., Guedj, F., Pennings, J. L. A., Ms, D. S., Neri, C., & Bianchi, D. W. (2016). Males are from Mars, and females are from Venus: sex-specific fetal brain gene expression signatures in a mouse model of maternal diet-induced obesity. *The American Journal of Obstetrics & Gynecology*, 214(5), 623.e1-623.e10.
- Edwards, D. A., Mather, R. A., & Dodd, G. H. (1988). Spatial variation in response to odorants on the rat olfactory epithelium. *Experientia*, 44(3), 208–211.
- Ekstrand, J. J., Domroese, M. E., Feig, S. L., Illig, K. R., & Haberly, L. B. (2001). Immunocytochemical analysis of basket cells in rat piriform cortex. *Journal of Comparative Neurology*, 434(3), 308–328.
- El Messari, S., Leloup, C., Quignon, M., Brisorgueil, M. J., Penicaud, L., & Arluison, M. (1998). Immunocytochemical localization of the insulin-responsive glucose transporter 4 (Glut4) in the rat central nervous system. *Journal of Comparative Neurology*, 399(4), 492–512.
- Elmqvist, J. K., Bjørbaek, C., Ahima, R. S., Flier, J. S., & Saper, C. B. (1998). Distributions of Leptin Receptor mRNA Isoforms in the Rat Brain. *J. Comp. Neurol*, 395(February), 535–547.
- Elsberg, C. A., Levy, I., & Brewer, E. D. (1936). A new method for testing the sense of smell and for the establishment of olfactory values of odorous substances. *Science*. US: American Assn for the Advancement of Science.
- Eng, D. L., & Kocsis, J. D. (1987). Activity-dependent changes in extracellular potassium and excitability in turtle olfactory nerve. *Journal of Neurophysiology*, 57(3), 740–754.
- Engelen, L., De Wijk, R. A., Prinz, J. F., Van Der Bilt, A., & Bosman, F. (2003). The relation between saliva flow after different stimulations and the perception of flavor and texture attributes in custard desserts. *Physiology and Behavior*, 78(1), 165–169.
- Ennis, M., Zhou, F., Ciombor, K. J., Aroniadou-anderjaska, V., Hayar, A., Borrelli, E., ... Dopamine, D. (2001). Dopamine D2 receptor-mediated presynaptic inhibition of olfactory nerve terminals. *Journal of Neurophysiology*, 86(6), 2986–2997.
- Ernst, A., & Frisé, J. (2015). Adult Neurogenesis in Humans- Common and Unique Traits in Mammals. *PLoS Biology*, 13(1), 1–12.
- Eyre, M. D., Antal, M., & Nusser, Z. (2008). Distinct Deep Short-Axon Cell Subtypes of the Main Olfactory Bulb Provide Novel Intrabulbar and Extrabulbar GABAergic Connections. *Journal of Neuroscience*, 28(33), 8217–8229.
- Fadool, D. A., Tucker, K., & 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(9), 10–12.
- Fadool, D. A., Tucker, K., Perkins, R., Fasciani, G., Thompson, R. N., Parsons, A. D., ... Kaczmarek, L. K. (2004). Kv1.3 channel gene-targeted deletion produces “super-smeller mice” with altered glomeruli, interacting scaffolding proteins, and biophysics. *Neuron*, 41(3), 389–404.
- Fadool, D. A., Tucker, K., Phillips, J. J., & Simmen, J. A. (2000). Brain insulin receptor causes activity-dependent current suppression in the olfactory bulb through multiple phosphorylation of Kv1.3. *Journal of Neurophysiology*, 83(4), 2332–2348.
- Fallon, J. H. (1983). The islands of Calleja complex of rat basal forebrain II: Connections of medium and large sized cells. *Brain Research Bulletin*, 10(6), 775–793.
- Fallon, J. H., Riley, J. N., Sipe, J. C., & Moore, R. Y. (1978). The islands of calleja: Organization and connections. *Journal of Comparative Neurology*, 181(2), 375–395.

- Fardone, E., Celen, A. B., Schreiter, N. A., Thiebaud, N., Cooper, M. L., & Fadool, D. A. (2018). Loss of odor-induced c-Fos expression of juxtglomerular activity following maintenance of mice on fatty diets. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 1–11.
- Fernandez-Garcia, J. C., Alcaide, J., Santiago-Fernandez, C., Roca-Rodriguez, M. M., Aguera, Z., Baños, R., ... Garrido-Sanchez, L. (2017). An increase in visceral fat is associated with a decrease in the taste and olfactory capacity. *PLoS One*, 12(2), e0171204.
- Ferrero, D. M., Lemon, J. K., Fluegge, D., Pashkovski, S. L., Korzan, W. J., Datta, S. R., ... Liberles, S. D. (2011). Detection and avoidance of a carnivore odor by prey. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(27), 11235–11240. h
- Ferrero, D. M., & Liberles, S. D. (2010). The secret codes of mammalian scents. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Systems Biology and Medicine*, 2(1), 23–33.
- Ferriday, D., & Brunstrom, J. M. (2011). 'I just can't help myself': effects of food-cue exposure in overweight and lean individuals. *International Journal of Obesity*, 35(1), 142–149.
- Firestein, S. (2001). How the olfactory system makes sense of scents. *Nature*, 413(6852), 211–218.
- FitzGerald, B. J., Richardson, K., & Wesson, D. W. (2014). Olfactory tubercle stimulation alters odor preference behavior and recruits forebrain reward and motivational centers. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 8(March), 1–9.
- Franklin, K., & Paxinos, G. (2008). *The mouse brain in stereotaxic coordinates* (3rd editio). Academic Press/Elsevier.
- Franklin, R. J. M., & Barnett, S. C. (2000). Olfactory ensheathing cells and CNS regeneration: The sweet smell of success? *Neuron*, 28(1), 15–18.
- Frasnelli, J., & Hummel, T. (2005). Olfactory dysfunction and daily life. *European Archives of Oto-Rhino-Laryngology*, 262(3), 231–235.
- Friedman, J. (2014). Leptin at 20: An overview. *Journal of Endocrinology*, 223(1), T1–T8.
- Fulle, H. J., Vassar, R., Foster, D. C., Yang, R. B., Axel, R., & Garbers, D. L. (1995). A receptor guanylyl cyclase expressed specifically in olfactory sensory neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92(8), 3571–3575.
- Furchtgott, E., & Friedman, M. P. (1960). The effects of hunger on taste and odor RLs. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*. US: American Psychological Association.
- Fuss, S. H., Omura, M., & Mombaerts, P. (2005). The Grueneberg ganglion of the mouse projects axons to glomeruli in the olfactory bulb. *The European Journal of Neuroscience*, 22(10), 2649–54.
- Gabory, A., Attig, L., & Junien, C. (2011). Developmental programming and epigenetics. *Am J Clin Nutr*, 94, 1943–1952.
- Gadziola, M. A., & Wesson, D. W. (2016). The Neural Representation of Goal-Directed Actions and Outcomes in the Ventral Striatum's Olfactory Tubercle. *Journal of Neuroscience*, 36(2), 548–560.
- Gaillard, D., Passilly-Degrace, P., & Besnard, P. (2008). Molecular mechanisms of fat preference and overeating. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1141(1), 163–175.
- Gaillet-Torrent, M., Sulmont-Rossé, C., Issanchou, S., Chabanet, C., & Chambaron, S. (2014). Impact of a non-attentively perceived odour on subsequent food choices. *Appetite*, 76, 17–22.
- Galef, B. G., & Henderson, P. W. (1972). Mother's milk: a determinant of the feeding preferences of weaning rat pups. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, 78(2), 213–219.
- Gavaghan McKee, C. L., Wilson, I. D., & Nicholson, J. K. (2006). Metabolic phenotyping of nude and normal (Alpk:ApfCD, C57BL10J) mice. *Journal of Proteome Research*, 5(2), 378–384. h
- Gavrilova, O., Barr, V., Marcus-Samuels, B., & Reitman, M. (1997). Hyperleptinemia of pregnancy associated with the appearance of a circulating form of the leptin receptor. *Journal of Biological*

Chemistry, 272(48), 30546–30551.

- Gawrisch, K., Soubias, O., & Mihailescu, M. (2008). Insights from biophysical studies on the role of polyunsaturated fatty acids for function of G-protein coupled membrane receptors. *Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, 79(3–5), 131–134.
- Gesteland, R. C. (1986). Speculations on receptor cells as analyzers and filters. *Experientia*, 42(3), 287–291.
- Gesteland, R. C., Yancey, R. A., & Farbman, A. I. (1982). Development of olfactory receptor neuron selectivity in the rat fetus. *Neuroscience*, 7(12).
- Getchell, T. V., Kwong, K., Saunders, C. P., Stromberg, A. J., & Getchell, M. L. (2006). Leptin regulates olfactory-mediated behavior in ob/ob mice. *Physiology and Behavior*, 87(5), 848–856.
- Ghatpande, A. S., & Reisert, J. (2011). Olfactory receptor neuron responses coding for rapid odour sampling. *Journal of Physiology*, 589(9), 2261–2273.
- Gheusi, G., Cremer, H., McLean, H., Chazal, G., Vincent, J. D., & Lledo, P. M. (2000). Importance of newly generated neurons in the adult olfactory bulb for odor discrimination. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(4), 1823–8.
- Giannetti, N., Saucier, D., & Astic, L. (1992). Organization of the septal organ projection to the main olfactory bulb in adult and newborn rats. *The Journal of Comparative Neurology*, 323(2), 288–298.
- Giannetti, N., Saucier, D., & Astic, L. (1995). Analysis of the possible alerting function of the septal organ in rats: A lesional and behavioral study. *Physiology and Behavior*, 58(5), 837–845.
- Gibbs, R. a, Weinstock, G. M., Metzker, M. L., Muzny, D. M., Sodergren, E. J., Scherer, S., ... Collins, F. (2004). Genome sequence of the Brown Norway rat yields insights into mammalian evolution. *Nature*, 428(6982), 493–521.
- Gluckman, P. D., & Hanson, M. A. (2004). The developmental origins of the metabolic syndrome. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 15(4), 183–187.
- Godfrey, K. M. (2002). The role of the placenta in fetal programming - a review. *Placenta*, 23(Supplement A).
- Goetzl, F. R., Abel, M. S., & Ahokas, A. J. (1950). Occurrence in normal individuals of diurnal variations in olfactory acuity. *Journal of Applied Physiology*, 2, 553–562.
- Goetzl, F. R., & Stone, F. (1947). Diurnal variations in acuity of olfaction and food intake. *Gastroenterology*(9).
- Gouveri, E., Katotomichelakis, M., Gouveris, H., Danielides, V., Maltezos, E., & Papanas, N. (2014). Olfactory dysfunction in type 2 diabetes mellitus: An additional manifestation of microvascular disease? *Angiology*, 65(10), 869–876.
- Graziadei, P. P. C., & Graziadei, G. A. M. (1979). Neurogenesis and neuron regeneration in the olfactory system of mammals. I. Morphological aspects of differentiation and structural organization of the olfactory sensory neurons. *Journal of Neurocytology*, 8(1), 1–18.
- Gregorio, M. B., Souza-Mello, V., Mandarim-de-lacerda, C. A., & Aguila, M. B. (2013). Maternal high-fat diet is associated with altered pancreatic remodelling in mice offspring. *European Journal of Nutrition*, 52, 759–769.
- Greiner, R. S., Moriguchi, T., Hutton, A., Slotnick, B. M., & Salem, N. (1999). Rats with low levels of brain docosahexaenoic acid show impaired performance in olfactory-based and spatial learning tasks. *Lipids*, 34 Suppl, S239–S243.
- Greiner, R. S., Moriguchi, T., Slotnick, B. M., Hutton, A., & Salem, N. (2001). Olfactory discrimination deficits in n - 3 fatty acid-deficient rats. *Physiology and Behavior*, 72(3), 379–385.
- Grosmaître, X., Fuss, S. H., Lee, A. C., Adipietro, K. a, Matsunami, H., Mombaerts, P., & Ma, M.

- (2009). SR1, a mouse odorant receptor with an unusually broad response profile. *The Journal of Neuroscience*, 29(46), 14545–14552.
- Grosmaître, X., Santarelli, L. C., Tan, J., Luo, M., & Ma, M. (2007). Dual functions of mammalian olfactory sensory neurons as odor detectors and mechanical sensors. *Nature Neuroscience*, 10(3), 348–354.
- Grotenhermen, F. (2004). Pharmacology of cannabinoids. *Neuroendocrinology Letters*, 25(1–2), 14–23.
- Grubb, M. S., Nissant, A., Murray, K., & Lledo, P.-M. (2008). Functional maturation of the first synapse in olfaction: development and adult neurogenesis. *Journal of Neuroscience*, 28(11), 2919–2932.
- Guérin, D., Peace, S. T., Didier, A., Linster, C., & Cleland, T. A. (2008). Noradrenergic neuromodulation in the olfactory bulb modulates odor habituation and spontaneous discrimination. *Behavioral Neuroscience*, 122(4), 816–826.
- Gugusheff, J. R., Ong, Z. Y., & Muhlhausler, B. S. (2015). The early origins of food preferences: Targeting the critical windows of development. *FASEB Journal*, 29(2), 365–373.
- Guild, A. A. (1956). Olfactory acuity in normal and obese human subjects: diurnal variations and the effect of d-amphetamine sulphate. *The Journal of Laryngology and Otology*, 70(7), 408–414.
- Guilloux, J., Seney, M., Edgar, N., & Sibille, E. (2011). Integrated behavioral z -scoring increases the sensitivity and reliability of behavioral phenotyping in mice: Relevance to emotionality and sex. *Journal of Neuroscience Methods*, 197(1), 21–31.
- Haberly, L. B. (2001). Parallel-distributed processing in olfactory cortex: new insights from morphological and physiological analysis of neuronal circuitry. *Chemical Senses*, 26(5), 551–576.
- Haberly, L. B., & Price, J. L. (1977). The axonal projection patterns of the mitral and tufted cells of the olfactory bulb in the rat. *Brain Research*, 129(1), 152–157.
- Hales, C. N., & Barker, D. J. P. (2001). The thrifty phenotype hypothesis. *British Medical Bulletin*, 60, 5–20.
- Hammer, F. J. (1951). The relation of odor, taste, and flicker-fusion thresholds to food intake. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, 403–411.
- Hansel, D. E., Eipper, B. A., & Ronnett, G. V. (2001). Neuropeptide Y functions as a neuroproliferative factor. *Nature*, 410(6831), 940–944.
- Hansen, A., & Finger, T. E. (2008). Is TrpM5 a reliable marker for chemosensory cells? Multiple types of microvillous cells in the main olfactory epithelium of mice. *BMC Neuroscience*, 9, 115.
- Harder, T., Rodekamp, E., Schellong, K., Dudenhausen, J. W., & Plagemann, A. (2007). Birth weight and subsequent risk of type 2 diabetes: A meta-analysis. *American Journal of Epidemiology*, 165(8), 849–857.
- Harding, J., Graziadei, P. P. C., Graziadei, G. A. M., & Margolis, F. L. (1977). Denervation in the primary olfactory pathway of mice. IV. Biochemical and morphological evidence for neuronal replacement following nerve section. *Brain Research*, 132(1), 11–28.
- Harding, J. W., Getchell, T. V., & Margolis, F. L. (1978). Denervation of the primary olfactory pathway in mice. V. Long-term effect of intranasal ZnSO<sub>4</sub> irrigation on behavior, biochemistry and morphology. *Brain Research*, 140, 271–285.
- Hardy, A. B., Aioun, J., Baly, C., Julliard, K. A., Caillol, M., Salesse, R., & Duchamp-Viret, P. (2005). Orexin A modulates mitral cell activity in the rat olfactory bulb: Patch-clamp study on slices, immunocytochemical localization of orexin receptors. *Endocrinology*, 146(9), 4042–4053.
- Hass, N., Haub, H., Stevens, R., Breer, H., & Schwarzenbacher, K. (2008). Expression of adiponectin receptor 1 in olfactory mucosa of mice. *Cell and Tissue Research*, 334(2), 187–197.
- Hatanaka, Y., Wada, K., & Kabuta, T. (2016). Maternal high-fat diet leads to persistent synaptic

- instability in mouse offspring via oxidative stress during lactation. *Neurochemistry International*, 1–10.
- Haynes, A. C., Jackson, B., Overend, P., Buckingham, R. E., Wilson, S., Tadayyon, M., & Arch, J. R. S. (1999). Effects of single and chronic intracerebroventricular administration of the orexins on feeding in the rat. *Peptides*, 20(9), 1099–1105.
- Hegg, C. C., Jia, C., Chick, W. S., Restrepo, D., & Hansen, A. (2010). Microvillous cells expressing IP3 receptor type 3 in the olfactory epithelium of mice. *European Journal of Neuroscience*, 32(10), 1632–1645.
- Hegoburu, C., Shionoya, K., Garcia, S., Messaoudi, B., Thévenet, M., & Mouly, A.-M. (2011). The RUB cage: respiration-ultrasonic vocalizations-behavior acquisition setup for assessing emotional memory in rats. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 5, 1–13.
- Hermann, H., Marsicano, G., & Lutz, B. (2002). Coexpression of the cannabinoid receptor type 1 with dopamine and serotonin receptors in distinct neuronal subpopulations of the adult mouse forebrain. *Neuroscience*, 109(3), 451–460.
- Heydel, J. M., Coelho, A., Thiebaud, N., Legendre, A., Bon, A. M. Le, Faure, P., ... Briand, L. (2013). Odorant-binding proteins and xenobiotic metabolizing enzymes: Implications in olfactory perireceptor events. *Anatomical Record*, 296(9), 1333–1345.
- Heydel, J. M., Holsztynska, E. J., Legendre, A., Thiebaud, N., Artur, Y., & Le Bon, A. M. (2010). UDP-glucuronosyltransferases (UGTs) in neuro-olfactory tissues: Expression, regulation, and function. *Drug Metabolism Reviews*, 42(1), 71–94.
- Heydel, J. M., Leclerc, S., Bernard, P., Pelczar, H., Gradinaru, D., Magdalou, J., ... Goudonnet, H. (2001). Rat olfactory bulb and epithelium UDP-glucuronosyltransferase 2A1 (UGT2A1) expression: In situ mRNA localization and quantitative analysis. *Molecular Brain Research*, 90(1), 83–92.
- Hichami, A., Datiche, F., Ullah, S., Liénard, F., Chardigny, J. M., Cattarelli, M., & Khan, N. A. (2007). Olfactory discrimination ability and brain expression of c-fos, Gir and Glut1 mRNA are altered in n - 3 fatty acid-depleted rats. *Behavioural Brain Research*, 184(1), 1–10.
- Hinds, J. W. (1968). Autoradiographic study of histogenesis in the mouse olfactory bulb I. Time of origin of neurons and neuroglia. *Journal of Comparative Neurology*, 134(3), 287–304.
- Hoggard, N., Hunter, L., Duncan, J. S., Williams, L. M., Trayhurn, P., & Mercer, J. G. (1997). Leptin and leptin receptor mRNA and protein expression in the murine fetus and placenta. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(20), 11073–8.
- Hu, J., Zhong, C., Ding, C., Chi, Q., Walz, A., Mombaerts, P., ... Luo, M. (2007). Detection of Near-Atmospheric Concentrations of CO<sub>2</sub> by an Olfactory Subsystem in the Mouse. *Science*, 317(August), 953–957.
- Hummel, T., & Nordin, S. (2005). Olfactory disorders and their consequences for quality of life. *Acta Oto-Laryngologica*, 125(2), 116–121.
- Hummel, T., Sekinger, B., Wolf, S. R., Pauli, E., Kobal, G., & Hummel, T. (1997). "Sniffin" Sticks': Olfactory Performance Assessed by the Combined Testing of Odor Identification, Odor Discrimination and Olfactory Threshold. *Chemical Senses*, (June), 39–52.
- Huszar, D., Lynch, C. A., Fairchild-Huntress, V., Dunmore, J. H., Fang, Q., Berkemeier, L. R., ... Frank, L. (1997). Targeted disruption of the melanocortin-4 receptor results in obesity in mice. *Cell*, 88(1), 131–141.
- Igarashi, K. M., Lu, L., Colgin, L. L., Moser, M. B., & Moser, E. I. (2014). Coordination of entorhinal-hippocampal ensemble activity during associative learning. *Nature*, 510(7503), 143–147.
- Ikemoto, A., Nitta, A., Furukawa, S., Ohishi, M., Nakamura, A., Fujii, Y., & Okuyama, H. (2000). Dietary n-3 fatty acid deficiency decreases nerve growth factor content in rat hippocampus. *Neuroscience Letters*, 285(2), 99–102.

- Illig, K. R. (2005). Projections from orbitofrontal cortex to anterior piriform cortex in the rat suggest a role in olfactory information processing. *Journal of Comparative Neurology*, 488(2), 224–231.
- Illig, K. R., & Haberly, L. B. (2003). Odor-evoked activity is spatially distributed in piriform cortex. *Journal of Comparative Neurology*, 457(4), 361–373.
- Imai, T., Suzuki, M., & Hitoshi, S. (2006). Odorant receptor–derived cAMP signals direct axonal targeting. *Science*, 314(April), 657–660.
- Imaizumi, T., Lankford, K. L., & Kocsis, J. D. (2000). Transplantation of olfactory ensheathing cells or Schwann cells restores rapid and secure conduction across the transected spinal cord. *Brain Research*, 854(1–2), 70–78.
- Imamura, F., Ayoub, A. E., Rakic, P., & Greer, C. A. (2011). Timing of neurogenesis is a determinant of olfactory circuitry. *Nature Neuroscience*, 14(3), 331–337.
- Innis, S. M. (2007). Human milk: Maternal dietary lipids and infant development. *Proceedings of the Nutrition Society*, 66(3), 397–404.
- INSERM, & DREES. (2017). Enquête nationale périnatale 2016.
- Isaacson, J. S., & Strowbridge, B. W. (1998). Olfactory reciprocal synapses: Dendritic signaling in the CNS. *Neuron*, 20(4), 749–761.
- Ishikawa, J., Ishikawa, A., & Nakamura, S. (2007). Interferon-alpha reduces the density of monoaminergic axons in the rat brain. *Neuroreport*, 18(2), 137–140.
- Ito, J., Nakagawa, K., Kato, S., Miyazawa, T., Kimura, F., & Miyazawa, T. (2016). The combination of maternal and offspring high-fat diets causes marked oxidative stress and development of metabolic syndrome in mouse offspring. *Life Sciences*, 151, 70–75.
- Janowitz, H. D., & Grossman, M. I. (1949). Gustoolfactory thresholds in relation to appetite and hunger sensations. *Journal of Applied Physiology Applied Physiology*, 2(4), 217–222.
- Janthakhin, Y., Rincel, M., Costa, A. M., Darnaudéry, M., & Ferreira, G. (2017). Maternal high-fat diet leads to hippocampal and amygdala dendritic remodeling in adult male offspring. *Psychoneuroendocrinology*, 83, 49–57.
- Jarskog, L. F., Xiao, H., Wilkie, M. B., Lauder, J. M., & Gilmore, J. H. (1997). Cytokine regulation of embryonic rat dopamine and serotonin neuronal survival in vitro. *International Journal of Developmental Neuroscience*, 15(6), 711–716.
- Jia, C., & Hegg, C. C. (2010). NPY mediates ATP-induced neuroproliferation in adult mouse olfactory epithelium. *Neurobiology of Disease*, 38(3), 405–413.
- Jiao, F., Yan, X., Yu, Y., Zhu, X., Ma, Y., Yue, Z., ... Yan, Z. (2016). Protective effects of maternal methyl donor supplementation on adult offspring of high fat diet-fed dams. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 34, 42–51.
- Jing, Y. H., Qi, C. C., Yuan, L., Liu, X. W., Gao, L. P., & Yin, J. (2017). Adult neural stem cell dysfunction in the subventricular zone of the lateral ventricle leads to diabetic olfactory defects. *Neural Regeneration Research*, 12(7), 1111–1118.
- Johnson, W. G., & Wildman, H. E. (1983). Influence of external and covert food stimuli on insulin secretion in obese and normal persons. *Behavioral Neuroscience*, 97(6), 1025–1028.
- Jones, D. T., & Reed, R. R. (1988). Golf: An Olfactory Neuron Specific-G Protein. *Science*, 244, 790–795.
- Jones, H. N., Woollett, L. A., Barbour, N., Prasad, P. D., Powell, T. L., & Jansson, T. (2008). High-fat diet before and during pregnancy causes marked up-regulation of placental nutrient transport and fetal overgrowth in C57/BL6 mice. *The FASEB Journal*, 23(1), 271–278.
- Juilfs, D. M., Fulle, H.-J., Zhao, A. Z., Houslay, M. D., Garbers, D. L., & Beavo, J. A. (1997). A subset of olfactory neurons that selectively express cGMP-stimulated phosphodiesterase (PDE2) and

- guanylyl cyclase-D define a unique olfactory signal transduction pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94(7), 3388–3395.
- Julliard, A. K., Chaput, M. A., Apelbaum, A., Aimé, P., Mahfouz, M., & Duchamp-Viret, P. (2007). Changes in rat olfactory detection performance induced by orexin and leptin mimicking fasting and satiation. *Behavioural Brain Research*, 183(2), 123–129.
- Kadohisa, M., & Wilson, D. A. (2006). Separate encoding of identity and similarity of complex familiar odors in piriform cortex. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(41), 15206–15211.
- Kageyama, R., Imayoshi, I., & Sakamoto, M. (2012). The role of neurogenesis in olfaction-dependent behaviors. *Behavioural Brain Research*, 227(2), 459–463.
- Kaneko-Goto, T., Sato, Y., Katada, S., Kinameri, E., Yoshihara, S., Nishiyori, A., ... Yoshihara, Y. (2013). Goofy coordinates the acuity of olfactory signaling. *The Journal of Neuroscience*, 33(32), 12987–96, 12996a.
- Kang, S. S., Kurti, A., Fair, D. A., & Fryer, J. D. (2014). Dietary intervention rescues maternal obesity induced behavior deficits and neuroinflammation in offspring. *Journal of Neuroinflammation*, 11(1).
- Kannan, S., Saadani-Makki, F., Balakrishnan, B., Dai, H., Chakraborty, P. K., Janisse, J., ... Chugani, D. C. (2011). Decreased cortical serotonin in neonatal rabbits exposed to endotoxin in utero. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 31(2), 738–749.
- Karlsson, A.C., Lindroos, A.K., Lissner, L., Torgerson, J.S., Carlsson, B., Carlsson, L.M. & Sjöström L. Evidence for gender-specific associations between leptin and olfaction. *The journal of gender-specific medicine*, 5(6),25-32.
- Kashiwadani, H., Sasaki, Y. F., Uchida, N., & Mori, K. (1999). Synchronized oscillatory discharges of mitral/tufted cells with different molecular receptive ranges in the rabbit olfactory bulb. *Journal of Neurophysiology*, 82(4), 1786–1792.
- Katada, S. (2005). Structural basis for a broad but selective ligand spectrum of a mouse olfactory receptor: mapping the odorant-binding site. *The Journal of Neuroscience*, 25(7), 1806–1815.
- Kato, H. K., Gillet, S. N., Peters, A. J., Isaacson, J. S., & Komiyama, T. (2013). Parvalbumin-expressing interneurons linearly control olfactory bulb output. *Neuron*, 80(5), 1218–1231.
- Kay, L. M., & Laurent, G. (1999). Odor- and context-dependent modulation of mitral cell activity in behaving rats. *Nature Neuroscience*, 2(11), 1003–1009.
- Keller, M., Perrin, G., Meurisse, M., Ferreira, G., & Lévy, F. (2004). Cortical and medial amygdala are both involved in the formation of olfactory offspring memory in sheep. *European Journal of Neuroscience*, 20(12), 3433–3441.
- Kelsch, W., Lin, C.-W., & Lois, C. (2008). Sequential development of synapses in dendritic domains during adult neurogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(43), 16803–
- Kermen, F., Midroit, M., Kuczewski, N., Forest, J., Thévenet, M., Sacquet, J., ... Mandairon, N. (2016). Topographical representation of odor hedonics in the olfactory bulb. *Nature Neuroscience*, 19(7), 5–9.
- Kern, R. C., Kerr, T. P., & Getchell, T. V. (1991). Ultrastructural localization of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase in rodent olfactory epithelium. *Brain Research*, 546(1), 8–17.
- Khalyfa, A., Carreras, A., Hakim, F., Cunningham, J. M., Wang, Y., & Gozal, D. (2013). Effects of late gestational high fat diet on body weight, metabolic regulation and adipokine expression in offspring. *International Journal of Obesity*, 37(11), 1481–1489.
- Kikuta, S., Sato, K., Kashiwadani, H., Tsunoda, K., Yamasoba, T., & Mori, K. (2010). Neurons in the anterior olfactory nucleus pars externa detect right or left localization of odor sources. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(27), 12363–12368.

- Kim, D. W., Glendining, K. A., & Jasoni, G. C. L. (2016). Maternal obesity leads to increased proliferation and numbers of astrocytes in the developing fetal and neonatal mouse hypothalamus. *International Journal of Developmental Neuroscience*.
- Kim, D. W., Young, S. L., Grattan, D. R., & Jasoni, C. L. (2014). Obesity during pregnancy disrupts placental morphology, cell proliferation, and inflammation in a sex-specific manner across gestation in the mouse. *Biology of Reproduction*, 90(6), 1–11.
- Kim, H. Y., Akbar, M., Lau, A., & Edsall, L. (2000). Inhibition of neuronal apoptosis by docosahexaenoic acid (22:6n-3): Role of phosphatidylserine in antiapoptotic effect. *Journal of Biological Chemistry*, 275(45), 35215–35223.
- Kim, H. Y., & Edsall, L. (1999). The role of docosahexaenoic acid (22:6n-3) in neuronal signaling. *Lipids*, 34 Suppl(1992), S249-50.
- Kinsley, C. H., Morse, A. C., Zoumas, C., Corl, S., & Billack, B. (1995). Intracerebroventricular infusions of morphine, and blockade with naloxone, modify the olfactory preferences for pup odors in lactating rats. *Brain Research Bulletin*, 37(1), 103–107.
- Kleene, S. J. (1999). Both external and internal calcium reduce the sensitivity of the olfactory cyclic-nucleotide-gated channel to CAMP. *Journal of Neurophysiology*, 81(6), 2675–82.
- Kleene, S. J. (2008). The electrochemical basis of odor transduction in vertebrate olfactory cilia. *Chemical Senses*, 33(9), 839–859.
- Kleene, S. J., & Gesteland, R. C. (1981). Dissociation of frog olfactory epithelium. *Brain Research*, 229, 536–540.
- Kobayakawa, K., Kobayakawa, R., Matsumoto, H., Oka, Y., Imai, T., Ikawa, M., ... Sakano, H. (2007). Innate versus learned odour processing in the mouse olfactory bulb. *Nature*, 450(7169), 503–508.
- Kojima, M., Hosoda, H., Date, Y., Nakazato, M., Matsuo, H., & Kangawa, K. (1999). Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature*, 402(6762), 656–660.
- Kojima, S., Catavero, C., & Rinaman, L. (2016). Maternal high-fat diet increases independent feeding in pre-weanling rat pups. *Physiology and Behavior*, 157, 237–245.
- Kondo, K., Suzukawa, K., Sakamoto, T., Watanabe, K., Kanaya, K., Ushio, M., ... Yamasoba, T. (2010). Age-related changes in cell dynamics of the postnatal mouse olfactory neuroepithelium: Cell proliferation, neuronal differentiation, and cell death. *Journal of Comparative Neurology*, 518(11), 1962–1975.
- Konkimalla, A., & Tata, P. R. (2017). Plasticity in olfactory epithelium: is it a sniffer or shape shifter? *Cell Stem Cell*, 21(6), 707–708.
- Korgan, A. C., Perrot, T. S., Leary, E. O., Bauer, J., Fortier, A., & Weaver, I. C. G. (2016). Effects of paternal predation risk and rearing environment on maternal investment and development of defensive desponses in the offspring, 3(December), 1–14.
- Kosaka, K., Heizmann, C. W., & Kosaka, T. (1994). Calcium-binding protein parvalbumin-immunoreactive neurons in the rat olfactory bulb. 1. Distribution and structural features in adult rat. *Experimental Brain Research*, 99, 191–204.
- Kouzarides, T. (2007). Chromatin modifications and their function. *Cell*, 128(4), 693–705.
- Kurahashi, T. (1989). Activation by odorants of cation-selective conductance in the olfactory receptor cell isolated from the newt. *Journal of Physiology*, 419, 177–192.
- Lacroix, M. C., Badonnel, K., Meunier, N., Tan, F., Poupon, C. S. Le, Durieux, D., ... Caillol, M. (2008). Expression of insulin system in the olfactory epithelium: First approaches to its role and regulation. *Journal of Neuroendocrinology*, 20(10), 1176–1190.
- Lacroix, M. C., Rodriguez-Enfedaque, A., Grébert, D., Laziz, I., Meunier, N., Monnerie, R., ... Renaud, F. (2011). Insulin but not leptin protects olfactory mucosa from apoptosis. *Journal of*

Neuroendocrinology, 23(7), 627–640.

- Lagier, S., Panzanelli, P., Russo, R. E., Nissant, A., Bathellier, B., Sassoè-Pognetto, M., ... Lledo, P.-M. (2007). GABAergic inhibition at dendrodendritic synapses tunes gamma oscillations in the olfactory bulb. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104(22), 7259–7264.
- Lam, R. S., & Mombaerts, P. (2013). Odorant responsiveness of embryonic mouse olfactory sensory neurons expressing the odorant receptors S1 or MOR23. *European Journal of Neuroscience*, 38(2), 2210–2217.
- LaMantia, a S., & Purves, D. (1989). Development of glomerular pattern visualized in the olfactory bulbs of living mice. *Nature*, 342, 189–92.
- Landis, B. N., Konnerth, C. G., & Hummel, T. (2004). A study on the frequency of olfactory dysfunction. *The Laryngoscope*, 114(10), 1764–9.
- Lappas, M., Permezel, M., & Rice, G. E. (2005). Leptin and adiponectin stimulate the release of proinflammatory cytokines and prostaglandins from human placenta and maternal adipose tissue via nuclear factor- $\kappa$ B, peroxisomal proliferator-activated receptor- $\gamma$  and extracellularly regulated kinase 1/2. *Endocrinology*, 146(8), 3334–3342.
- Laux, A., Muller, A. H., Miehe, M., Dirrig-Grosch, S., Deloulme, J. C., Delalande, F., ... Goumon, Y. (2011). Mapping of endogenous morphine-like compounds in the adult mouse brain: Evidence of their localization in astrocytes and GABAergic cells. *Journal of Comparative Neurology*, 519(12), 2390–2416.
- Lazarini, F., & Lledo, P. M. (2011). Is adult neurogenesis essential for olfaction? *Trends in Neurosciences*, 34(1), 20–30.
- Lazarini, F., Mouthon, M. A., Gheusi, G., de Chaumont, F., Olivo-Marin, J. C., Lamarque, S., ... Lledo, P. M. (2009). Cellular and behavioral effects of cranial irradiation of the subventricular zone in adult mice. *PLoS ONE*, 4(9), 1–11.
- Le Bon, A. M., Deprêtre, N., Sibille, E., Cabaret, S., Grégoire, S., Soubeyre, V., ... Berdeaux, O. (2018). Comprehensive study of rodent olfactory tissue lipid composition. *Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, 131, 32–43.
- Le Clair, C., Abbi, T., Sandhu, H., & Tappia, P. S. (2009). Impact of maternal undernutrition on diabetes and cardiovascular disease risk in adult offspring. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 87(3), 161–179.
- Le Floch, J. P., Le Lièvre, G., Labroue, M., Paul, M., Peynegre, R., & Perlemuter, L. (1993). Smell dysfunction and related factors in diabetic patients. *Diabetes Care*, 16(6), 934–7.
- Le Magnen, J. (2001). My scientific life: 40 years at the College de France. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 25(5), 375–94.
- Leinders-Zufall, T., Cockerham, R. E., Michalakis, S., Biel, M., Garbers, D. L., Reed, R. R., ... Munger, S. D. (2007). Contribution of the receptor guanylyl cyclase GC-D to chemosensory function in the olfactory epithelium. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(36), 14507–14512.
- Lemaire, M., Böhme, G. A., Piot, O., Roques, B. P., & Blanchard, J. C. (1994). CCK-A and CCK-B selective receptor agonists and antagonists modulate olfactory recognition in male rats. *Psychopharmacology*, 115(4), 435–440.
- Lemasson, M., Saghatelian, A., Olivo-Marin, J. C., & Lledo, P.-M. (2005). Neonatal and adult neurogenesis provide two distinct populations of newborn neurons to the mouse olfactory bulb. *Journal of Neuroscience*, 25(29), 6816–6825.
- Lépinay, A. L., Larrieu, T., Joffre, C., Acar, N., Gárate, I., Castanon, N., ... Darnaudéry, M. (2015). Perinatal high-fat diet increases hippocampal vulnerability to the adverse effects of subsequent high-fat feeding. *Psychoneuroendocrinology*, 53, 82–93.
- Levai, O., & Strotmann, J. (2003). Projection pattern of nerve fibers from the septal organ: Dil-tracing studies with transgenic OMP mice. *Histochemistry and Cell Biology*, 120(6), 483–492.

- Li, M., Sloboda, D. M., & Vickers, M. H. (2011). Maternal obesity and developmental programming of metabolic disorders in offspring: Evidence from animal models. *Experimental Diabetes Research*, 2011.
- Li, Q., Korzan, W. J., Ferrero, D. M., Chang, R. B., Roy, D. S., Buchi, M., ... Liberles, S. D. (2013). Synchronous evolution of an odor biosynthesis pathway and behavioral response. *Current Biology*, 23(1), 11–20.
- Li, W., Howard, J. D., Parrish, T. B., & Gottfried, J. A. (2008). Aversive learning enhances perceptual and cortical discrimination of indiscriminable odor cues. *Science*, 319(5871), 1842–1845.
- Liberles, S. D. (2015). Trace amine-associated receptors: Ligands, neural circuits, and behaviors. *Current Opinion in Neurobiology*, 34, 1–7.
- Liberles, S. D., & Buck, L. B. (2006). A second class of chemosensory receptors in the olfactory epithelium. *Nature*, 442(7103), 645–650.
- Liddle, R. A., Goldfine, I. D., Rosen, M. S., Taplitz, R. A., & Williams, J. A. (1985). Cholecystokinin bioactivity in human plasma. Molecular forms, responses to feeding, and relationship to gallbladder contraction. *Journal of Clinical Investigation*, 75(4), 1144–1152.
- Lietzau, G., Davidsson, W., Östenson, C. G., Chiazza, F., Nathanson, D., Pintana, H., ... Patrone, C. (2018). Type 2 diabetes impairs odour detection, olfactory memory and olfactory neuroplasticity; effects partly reversed by the DPP-4 inhibitor Linagliptin. *Acta Neuropathologica Communications*, 6(1), 1–15.
- Lin, W., Margolskee, R., Donnert, G., Hell, S. W., & Restrepo, D. (2007). Olfactory neurons expressing transient receptor potential channel M5 (TRPM5) are involved in sensing semiochemicals. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(7), 2471–2476.
- Linster, C., Garcia, P. A., Hasselmo, M. E., & Baxter, M. G. (2001). Selective loss of cholinergic neurons projecting to the olfactory system increases perceptual generalization between similar, but not dissimilar, odorants. *Behavioral Neuroscience*, 115(4), 826–833.
- Liu, S., & Shipley, M. T. (2010). Physiological roles of MOB CCKergic neurons [abstract]. *Chemical Senses*, 31(A33).
- Lledo, P. M., Alonso, M., & Grubb, M. S. (2006). Adult neurogenesis and functional plasticity in neuronal circuits. *Nature Reviews Neuroscience*, 7(3), 179–193.
- Loch, D., Heidel, C., Breer, H., & Strotmann, J. (2013). Adiponectin enhances the responsiveness of the olfactory system. *PLoS ONE*, 8(10).
- Lodovichi, C., & Belluscio, L. (2012). Odorant receptors in the formation of the olfactory bulb circuitry. *Physiology*, 27(4), 200–212.
- Lois, C., & Alvarez-Buylla, A. (1994). Long-distance neuronal migration in the adult mammalian brain. *Science (New York, NY)*, 264(5162), 1145–1148.
- Lowe, G., & Gold, G. H. (1993). Nonlinear amplification by calcium-dependent chloride channels in olfactory receptor cells. *Nature*, 366(6452), 283–286.
- Lu, B., Nagappan, G., Guan, X., Nathan, P. J., & Wren, P. (2013). BDNF-based synaptic repair as a disease-modifying strategy for neurodegenerative diseases. *Nature Reviews Neuroscience*, 14(6), 401–416.
- Lu, D. Y., Tsao, Y. Y., Leung, Y. M., & Su, K. P. (2010). Docosahexaenoic acid suppresses neuroinflammatory responses and induces heme oxygenase-1 expression in BV-2 microglia: Implications of antidepressant effects for omega-3 fatty acids. *Neuropsychopharmacology*, 35(11), 2238–2248.
- Lu, G. C., Rouse, D. J., DuBard, M., Cliver, S., Kimberlin, D., & Hauth, J. C. (2001). The effect of the increasing prevalence of maternal obesity on perinatal morbidity. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 185(4), 845–849.

- Lundström, J. N., Boesveldt, S., & Albrecht, J. (2011). Central processing of the chemical senses: An overview. *ACS Chemical Neuroscience*, 2(1), 5–16.
- Luo, Z. C., Nuyt, A. M., Delvin, E., Fraser, W. D., Julien, P., Audibert, F., ... Levy, E. (2013). Maternal and fetal leptin, adiponectin levels and associations with fetal insulin sensitivity. *Obesity*, 21(1), 210–216.
- Ma, J., Dankulich, L., & Graeme, L. (2011). Cholecystokinin: a peptide modulator of olfactory bulb output [abstract]. *Chemical Senses*, 31(A86).
- Ma, M., Grosmaître, X., Iwema, C. L., Baker, H., Greer, C. A., & Shepherd, G. M. (2003). Olfactory signal transduction in the mouse septal organ. *The Journal of Neuroscience*, 23(1), 317–324.
- Macrides, F., Davis, B. J., Youngs, W. M., Nadi, N. S., & Margolis, F. L. (1981). Cholinergic and catecholaminergic afferents to the olfactory bulb in the Hamster: A neuroanatomical, biochemical, and histochemical investigation. *Journal of Comparative Neurology*, 203(3), 495–514.
- Mailleux, P., & Vanderhaeghen, J. J. (1992). Distribution of neuronal cannabinoid receptor in the adult rat brain: A comparative receptor binding radioautography and in situ hybridization histochemistry. *Neuroscience*, 48(3), 655–668.
- Mainland, J. D., Lundström, J. N., Reisert, J., & Lowe, G. (2014). From molecule to mind: An integrative perspective on odor intensity. *Trends in Neurosciences*, 37(8), 443–454.
- Mainland, J., & Sobel, N. (2006). The sniff is part of the olfactory percept. *Chemical Senses*, 31(2), 181–196.
- Majid, A., Speed, L., Croijmans, I., & Arshamian, A. (2017). What makes a better smeller? *Perception*, 0(0).
- Maletic-Savatic, M., Malinow, R., & Svoboda, K. (1999). Rapid dendritic morphogenesis in CA1 hippocampal dendrites induced by synaptic activity. *Science*, 283, 1923–1927.
- Malnic, B., Hirono, J., Sato, T., & Buck, L. B. (1999). Combinatorial receptor codes for odors. *Cell*, 96(5), 713–723.
- Mamasuew, K., Hofmann, N., Breer, H., & Fleischer, J. (2011). Grueneberg ganglion neurons are activated by a defined set of odorants. *Chemical Senses*, 36(3), 271–282.
- Mandairon, N., Ferretti, C. J., Stack, C. M., Rubin, D. B., Cleland, T. A., & Linster, C. (2006). Cholinergic modulation in the olfactory bulb influences spontaneous olfactory discrimination in adult rats. *European Journal of Neuroscience*, 24(11), 3234–3244.
- Mandairon, N., Poncelet, J., Bensafi, M., & Didier, A. (2009). Humans and Mice Express Similar Olfactory Preferences. *Chemical Senses*, 34(1), 1–5.
- Mandairon, N., Sultan, S., Rey, N., Kermen, F., Moreno, M., Busto, G., ... Didier, A. (2009). A computer-assisted odorized hole-board for testing olfactory perception in mice. *Journal of Neuroscience Methods*, 180(2), 296–303.
- Mansour, a, Fox, C. a, Burke, S., Meng, F., Thompson, R. C., Akil, H., & Watson, S. J. (1994). Mu, delta, and kappa opioid receptor mRNA expression in the rat CNS: an in situ hybridization study. *The Journal of Comparative Neurology*, 350(3), 412–438.
- Marks, D. R., Tucker, K., Cavallin, M. A., Mast, T. G., & Fadool, D. A. (2009). Awake intranasal insulin delivery modifies protein complexes and alters memory, anxiety, and olfactory behaviors. *Journal of Neuroscience*, 29(20), 6734–6751.
- Marlier, L., Schaal, B., & Soussignan, R. (1998). Neonatal responsiveness to the odor of amniotic and lacteal fluids: A test of perinatal chemosensory continuity. *Child Development*, 69(3), 611–623.
- Martel, G., Simon, A., Nocera, S., Kalainathan, S., Pidoux, L., Blum, D., ... Viollet, C. (2015). Aging, but not tau pathology, impacts olfactory performances and somatostatin systems in THY-Tau22 mice. *Neurobiology of Aging*, 36(2), 1013–28.

- Martin, C., Gervais, R., Etienne, H., Messaoudi, B., & Ravel, N. (2004). Learning modulation of odor-induced oscillatory responses in the rat olfactory bulb: a correlate of odor recognition? *Journal of Neuroscience*, 24(2), 389–397.
- Martínez-Victoria, E., & Yago, M. D. (2012). Omega 3 polyunsaturated fatty acids and body weight. *British Journal of Nutrition*, 107(SUPPL. 2).
- Marzo, V. Di, Goparaju, S. K., Wang, L., & Liu, J. (2001). Leptin-regulated endocannabinoids are involved in maintaining food intake, 410(April), 822–825.
- Masuyama, H., & Hiramatsu, Y. (2014). Additive Effects of Maternal High Fat Diet during Lactation on Mouse Offspring. *PLoS ONE*, 9(3).
- Matsuda, L. A., Bonner, T. I., & Lolait, S. J. (1993). Localization of cannabinoid receptor mRNA in rat brain. *The Journal of Comparative Neurology*, 327(4), 535–550.
- Mayer, U., Ungerer, N., Klimmeck, D., Warnken, U., Schnölzer, M., Frings, S., & Möhrlen, F. (2008). Proteomic analysis of a membrane preparation from rat olfactory sensory cilia. *Chemical Senses*, 33(2), 145–162.
- McEwen, B. S., & Reagan, L. P. (2004). Glucose transporter expression in the central nervous system: Relationship to synaptic function. *European Journal of Pharmacology*, 490(1–3), 13–24.
- McEwen, D. P., Jenkins, P. M., & Martens, J. R. (2008). Chapter 12 Olfactory Cilia: Our Direct Neuronal Connection to the External World. *Current Topics in Developmental Biology* (1st ed., Vol. 85). Elsevier Inc.
- McGann, J. P. (2017). Poor human olfaction is a 19th-century myth. *Science*, 356(6338).
- Meister, B. (2007). Neurotransmitters in key neurons of the hypothalamus that regulate feeding behavior and body weight. *Physiology and Behavior*, 92(1–2), 263–271.
- Menco, B. P. M., & Morrison, E. E. (2003). Morphology of the mammalian olfactory epithelium: Form, fine structure function and pathology. *Chemical Senses* (Vol. 20).
- Mennella, J. A. (2009). Flavour programming during breast-feeding. In G. Goldberg, A. Prentice, A. Prentice, S. Filteau, & K. Simondon (Eds.), *Advances in Experimental Medicine and Biology* (pp. 113–120). Dordrecht: Springer Netherlands.
- Mennella, J. A., Jagnow, C. P., & Beauchamp, G. K. (2001). Prenatal and Postnatal Flavor Learning by Human Infants. *Pediatrics*, 107(6).
- Mennella, J. A., Johnson, A., & Beauchamp, G. K. (1995). Garlic ingestion by pregnant-women alters the odor of amniotic-fluid. *Chemical Senses*, 20(May), 207–209.
- Merkle, F. T., Fuentealba, L. C., Sanders, T. A., Magno, L., Kessar, N., & Alvarez-Buylla, A. (2014). Adult neural stem cells in distinct microdomains generate previously unknown interneuron types. *Nature Neuroscience*, 17(2), 207–214.
- Merkle, F. T., Mirzadeh, Z., & Alvarez-Buylla, A. (2007). Mosaic organization of neural stem cells in the adult brain. *Science*, 317(5836), 381–384.
- Meyer, M. R., Angele, A., Kremmer, E., Kaupp, U. B., & Muller, F. (2000). A cGMP-signaling pathway in a subset of olfactory sensory neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(19), 10595–600.
- Midroit, M. (2018). Signatures neurales de la valeur hédonique des odeurs chez la souris. (Thèse)
- Miragall, F., & Graziadei, G. A. M. (1982). Experimental studies on the olfactory marker protein. II. Appearance of the olfactory marker protein during differentiation of the olfactory sensory neurons of mouse: an immunohistochemical and autoradiographic study. *Brain Research*, 239(1), 245–250.
- Mitchell, D. C., Niu, S. L., & Litman, B. J. (2003). Enhancement of G protein-coupled signaling by DHA phospholipids. *Lipids*, 38(4), 437–443.

- Mitra, A., Alvers, K. M., Crump, E. M., & Rowland, N. E. (2008). Effect of high-fat diet during gestation, lactation, or postweaning on physiological and behavioral indexes in borderline hypertensive rats. *AJP: Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 296(1), R20–R28.
- Miyamichi, K., Shlomai-Fuchs, Y., Shu, M., Weissbourd, B. C., Luo, L., & Mizrahi, A. (2013). Dissecting local circuits: Parvalbumin interneurons underlie broad feedback control of olfactory bulb output. *Neuron*, 80(5), 1232–1245.
- Mizrahi, A. (2007). Dendritic development and plasticity of adult-born neurons in the mouse olfactory bulb. *Nature Neuroscience*, 10(4), 444–452.
- Mombaerts, P. (2006). Axonal wiring in the mouse olfactory system. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 22, 713–37.
- Mombaerts, P., Wang, F., Dulac, C., Chao, S. K., Nemes, A., Mendelsohn, M., ... Axel, R. (1996). Visualizing an olfactory sensory map. *Cell*, 87(4), 675–86.
- Montani, G., Tonelli, S., Elsaesser, R., Paysan, J., & Tirindelli, R. (2006). Neuropeptide Y in the olfactory microvillar cells. *European Journal of Neuroscience*, 24(1), 20–24.
- Moran, D. T., Rowley, J. C., Jafek, B. W., & Lovell, M. A. (1982). The fine structure of the olfactory mucosa in man. *Journal of Neurocytology*, 11(5), 721–746.
- Moreno, M. M., Linster, C., Escanilla, O., Sacquet, J., Didier, A., & Mandairon, N. (2009). Olfactory perceptual learning requires adult neurogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(42), 17980–17985.
- Mori, K., Nagao, H., & Yoshihara, Y. (1999). The olfactory bulb: coding and processing of odor molecule information. *Science*, 286(5440), 711–5.
- Mori, K., & Shepherd, G. M. (1994). Emerging principles of molecular signal processing by mitral/tufted cells in the olfactory bulb. *Seminars in Cell and Developmental Biology*.
- Morrison, E. E., & Costanzo, R. M. (1990). Morphology of the human olfactory epithelium. *The Journal of Comparative Neurology*, 297(1), 1–13.
- Moulton, D. G. (1974). Dynamics of Cell Populations in the Olfactory Epithelium. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 237, 52–61.
- Mouly, A. M., Fort, A., Ben-Boutayab, N., & Gervais, R. (2001). Olfactory learning induces differential long-lasting changes in rat central olfactory pathways. *Neuroscience*, 102(1), 11–21.
- Mouret, A., Gheusi, G., Gabellec, M.-M., de Chaumont, F., Olivo-Marin, J.-C., & Lledo, P.-M. (2008). Learning and survival of newly generated neurons: when time matters. *Journal of Neuroscience*, 28(45), 11511–11516.
- Mouret, A., Murray, K., & Lledo, P. M. (2009). Centrifugal drive onto local inhibitory interneurons of the olfactory bulb. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1170, 239–254.
- Muhlhauser, B. S., & Ailhaud, G. P. (2013). Omega-6 polyunsaturated fatty acids and the early origins of obesity. *Current Opinion in Endocrinology, Diabetes and Obesity*, 20(1), 56–61.
- Muhlhauser, B. S., & Ong, Z. Y. (2011). The fetal origins of obesity: Early origins of altered food intake. *Endocrine, Metabolic and Immune Disorders - Drug Targets*, 11(3), 189–197.
- Murabayashi, N., Sugiyama, T., Zhang, L., Kamimoto, Y., Umekawa, T., Ma, N., & Sagawa, N. (2013). Maternal high-fat diets cause insulin resistance through inflammatory changes in fetal adipose tissue. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*, 169, 39–44.
- Murthy, V. N. (2011). Olfactory Maps in the Brain. *Annual Review of Neuroscience*, 34(1), 233–258.
- Nagayama, S., Homma, R., & Imamura, F. (2014). Neuronal organization of olfactory bulb circuits. *Frontiers in Neural Circuits*, 8(September), 98.
- Naka, A., Riedl, M., Luger, A., Hummel, T., & Mueller, C. A. (2010). Clinical significance of smell and taste disorders in patients with diabetes mellitus. *European Archives of Oto-Rhino-Laryngology*,

267(4), 547–550.

- Nakamura, T., & Gold, G. H. (1987). A cyclic nucleotide-gated conductance in olfactory receptor cilia. *Nature*.
- Nambu, T., Sakurai, T., Mizukami, K., Hosoya, Y., Yanagisawa, M., & Goto, K. (1999). Distribution of orexin neurons in the adult rat brain. *Brain Research*, 827(1–2), 243–260.
- Naritsuka, H., Sakai, K., Hashikawa, T., Mori, K., & Yamaguchi, M. (2009). Perisomatic-targeting granule cells in the mouse olfactory bulb. *Journal of Comparative Neurology*, 515(4), 409–426.
- Nathanielsz, P. W., Poston, L., & Taylor, P. D. (2007). In utero exposure to maternal obesity and diabetes: animal models that identify and characterize implications for future health. *Obstetrics and Gynecology Clinics of North America*, 34(2), 201–212.
- Neary, M. T., & Batterham, R. L. (2009). Gut hormones: Implications for the treatment of obesity. *Pharmacology and Therapeutics*, 124(1), 44–56.
- Negróni, 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), 1–10.
- Nguyen, A. D., Herzog, H., & Sainsbury, A. (2011). Neuropeptide Y and peptide YY: important regulators of energy metabolism. *Current Opinion In Endocrinology, Diabetes, And Obesity*, 18(1), 56–60.
- Niculescu, M. D., & Lupu, D. S. (2009). High fat diet-induced maternal obesity alters fetal hippocampal development. *International Journal of Developmental Neuroscience*, 27, 627–633.
- Niimura, Y., & Nei, M. (2003). Evolution of olfactory receptor genes in the human genome. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(21), 12235–12240.
- Novotny, M., Harvey, S., Jemiolo, B., & Alberts, J. (1985). Synthetic pheromones that promote inter-male aggression in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 82(7), 2059–2061.
- Nunez-Parra, A., Cortes-Campos, C., Bacigalupo, J., de los Angeles Garcia, M., Nualart, F., & Reyes, J. G. (2011). Expression and distribution of facilitative glucose (GLUTs) and monocarboxylate/H<sup>+</sup> (MCTs) transporters in rat olfactory epithelia. *Chemical Senses*, 36(9), 771–780.
- O’Doherty, J., Rolls, E. T., Francis, S., Bowtell, R., McGlone, F., Kobal, G., ... Ahne, G. (2000). Sensory-specific satiety-related olfactory activation of the human orbitofrontal cortex. *Neuroreport*, 11(4), 893–897.
- Oben, J. A., Patel, T., Mouralidarane, A., Samuelsson, A. M., Matthews, P., Pombo, J., ... Taylor, P. (2010). Maternal obesity programmes offspring development of non-alcoholic fatty pancreas disease. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 394(1), 24–28.
- Obrebowski, A., Obrebowska-Karsznia, Z., & Gawliński, M. (2000). Smell and taste in children with simple obesity. *International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology*, 55(3), 191–196.
- OCDE. (2017). *Panorama de la santé 2017 : Les indicateurs de l’OCDE* (Editions O). Paris.
- Oken, E., & Gillman, M. W. (2003). Fetal origins of obesity. *Obesity Research*, 11(4), 496–506.
- Olszewski, P. K., Alsiö, J., Schiöth, H. B., & Levine, A. S. (2011). Opioids as facilitators of feeding: Can any food be rewarding? *Physiology and Behavior*, 104(1), 105–110. h
- OMS. (2018a). *Alimentation saine*. Retrieved from <http://www.who.int/fr/news-room/fact-sheets/detail/healthy-diet>
- OMS. (2018b). *Obésité et surpoids*. Retrieved from <http://www.who.int/fr/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>
- Omura, M., & Mombaerts, P. (2014). Trpc2-expressing sensory neurons in the main olfactory epithelium of the mouse. *Cell Reports*, 8(2), 583–595.

- Omura, M., & Mombaerts, P. (2015). Trpc2-expressing sensory neurons in the mouse main olfactory epithelium of type B express the soluble guanylate cyclase Gucy1b2. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 65, 114–124.
- Ong, Z. Y., & Muhlhausler, B. S. (2011). Maternal “junk-food” feeding of rat dams alters food choices and development of the mesolimbic reward pathway in the offspring. *The FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 25(7), 2167–2179.
- Oosting, A., Verkade, H. J., Kegler, D., Van De Heijning, B. J. M., & Van Der Beek, E. M. (2015). Rapid and selective manipulation of milk fatty acid composition in mice through the maternal diet during lactation. *Journal of Nutritional Science*, 4, 1–10.
- Orona, E., Scott, J. W., & Rainer, E. C. (1983). Different granule cell populations innervate superficial and deep regions of the external plexiform layer in rat olfactory bulb. *Journal of Comparative Neurology*, 217(2), 227–237.
- Osinski, B. L., & Kay, L. M. (2016). Granule cell excitability regulates gamma and beta oscillations in a model of the olfactory bulb dendrodendritic microcircuit. *Journal of Neurophysiology*, 116(2), 522–539.
- Otto, T., Schottler, F., Staubli, U., Eichenbaum, H., & Lynch, G. (1991). Hippocampus and olfactory discrimination learning: effects of entorhinal cortex lesions on olfactory learning and memory in a successive-cue, go-no-go task. *Behavioral Neuroscience*, 105(1), 111–119.
- Owen, S. J., Batzloff, M., Chehrehasa, F., Meedeniya, A., Casart, Y., Logue, C., ... Beacham, I. R. (2009). Nasal-associated lymphoid tissue and olfactory epithelium as portals of entry for *Burkholderia pseudomallei* in murine melioidosis. *The Journal of Infectious Diseases*, 199(12), 1761–1770.
- Pacifico, R., Dewan, A., Cawley, D., Guo, C., & Bozza, T. (2012). An olfactory subsystem that mediates high-sensitivity detection of volatile amines. *Cell Reports*, 2(1), 76–88.
- 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.
- Palkovits, M. (1992). Peptidergic neurotransmitters in the endocrine hypothalamus. *Ciba Foundation Symposium*, 168, 3–10.
- Palouzier-Paulignan, B., Lacroix, M.-C., Aime, P., Baly, C., Caillol, M., Congar, P., ... Fadool, D. A. (2012). Olfaction Under Metabolic Influences. *Chemical Senses*, 37(9), 769–797.
- Panchenko, P. E., Lemaire, M., Fneich, S., Voisin, S., Jouin, M., Junien, C., & Gabory, A. (2015). Epigénétique et Nutrition : impacts de l'alimentation maternelle sur le développement placentaire et la santé de la descendance. *Biologie Aujourd'hui*, 209(2), 175–187.
- Panzanelli, P., Bardy, C., Nissant, A., Pallotto, M., Sassoe-Pognetto, M., Lledo, P.-M., & Fritschy, J.-M. (2009). Early Synapse Formation in Developing Interneurons of the Adult Olfactory Bulb. *Journal of Neuroscience*, 29(48), 15039–15052.
- Pardridge, W. M., Boado, R. J., & Farrell, C. R. (1990). Brain-type Glucose Transporter the Blood-Brain Barrier (GLUT- 1) Is Selectively Localized to the Blood-Brain Barrier. *Journal of Biological Chemistry*, 265(29), 18035–18040.
- Parrish-Aungst, S., Shipley, M. T., Erdelyi, F., Szabo, G., & Puche, A. C. (2007). Quantitative Analysis of Neuronal Diversity in the Mouse Olfactory Bulb. *J Comp Neurol*, 501, 825–836.
- Pastor, A., Fernández-Aranda, F., Fitó, M., Jiménez-Murcia, S., Botella, C., Fernández-Real, J. M., ... de la Torre, R. (2016). A lower olfactory capacity is related to higher circulating concentrations of endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol and higher body mass index in women. *PLOS ONE*, 11(2), e0148734.
- Patel, M. S., & Srinivasan, M. (2011). Metabolic programming in the immediate postnatal life. *Annals of Nutrition and Metabolism*, 58(SUPPL. 2), 18–28.

- Patrick, R. P., & Ames, B. N. (2015). Vitamin D and the omega-3 fatty acids control serotonin synthesis and action, part 2: Relevance for ADHD, bipolar disorder, schizophrenia, and impulsive behavior. *FASEB Journal*, 29(6), 2207–2222.
- Peleg-raibstein, D., Luca, E., & Wolfrum, C. (2012). Maternal high-fat diet in mice programs emotional behavior in adulthood. *Behavioural Brain Research*, 233(2), 398–404.
- Pelosi, P. (1994). Odorant-binding proteins: structural aspects. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 855(November), 281–293.
- Perry, R. E., Al Ain, S., Raineki, C., Sullivan, R. M., & Wilson, D. A. (2016). Development of odor hedonics: experience-dependent ontogeny of circuits supporting maternal and predator odor responses in rats. *The Journal of Neuroscience*, 36(25), 6634–6650.
- Petzold, G. C., Hagiwara, A., & Murthy, V. N. (2009). Serotonergic modulation of odor input to the mammalian olfactory bulb. *Nature Neuroscience*, 12(6), 784–791.
- Peyron, C., Tighe, D. K., van den Pol, a N., de Lecea, L., Heller, H. C., Sutcliffe, J. G., & Kilduff, T. S. (1998). Neurons containing hypocretin (orexin) project to multiple neuronal systems. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 18(23), 9996–10015.
- Pinching, a J., & Powell, T. P. (1971). The neuron types of the glomerular layer of the olfactory bulb. *Journal of Cell Science*, 9(2), 305–345.
- Platt, K. M., Charnigo, R. J., & Pearson, K. J. (2014). Adult offspring of high-fat diet-fed dams can have normal glucose tolerance and body composition, 5, 229–239.
- Pomeroy, S. L., LaMantia, a S., & Purves, D. (1990). Postnatal construction of neural circuitry in the mouse olfactory bulb. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 10(6), 1952–1966.
- Poo, C., & Isaacson, J. S. (2009). Odor Representations in Olfactory Cortex: “Sparse” Coding, Global Inhibition, and Oscillations. *Neuron*, 62(6), 850–861.
- Portha, B., Giroix, M.-H., Tourrel-Cuzin, C., Le-Stunff, H., & Movassat, J. (2012). The GK Rat: A Prototype for the Study of Non-overweight Type 2 Diabetes BT - Animal Models in Diabetes Research. In H.-G. Joost, H. Al-Hasani, & A. Schürmann (Eds.), (pp. 125–159). Totowa, NJ: Humana Press.
- Potter, S. M., Zheng, C., Koos, D. S., Feinstein, P., Fraser, S. E., & Mombaerts, P. (2001). Structure and emergence of specific olfactory glomeruli in the mouse. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 21(24), 9713–23.
- Preibisch, S., Saalfeld, S., & Tomancak, P. (2009). Globally optimal stitching of tiled 3D microscopic image acquisitions. *Bioinformatics*, 25(11), 1463–1465.
- Price, J. L., Slotnick, B. M., & Revial, M. F. (1991). Olfactory projections to the hypothalamus. *The Journal of Comparative Neurology*, 306(3), 447–461.
- 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.
- Qu, L. P., Kahnt, T., Cole, S. M., & Gottfried, J. A. (2016). De novo emergence of odor category representations in the human brain. *The Journal of Neuroscience*, 36(2), 468–478.
- Ramón-Cueto, A., & Avila, J. (1998). Olfactory ensheathing glia: Properties and function. *Brain Research Bulletin*, 46(3), 175–187.
- Ravelli, A. C. J., Vandermeulen, J. H. P., Michels, R. P. J., Osmond, C., Barker, D. J. P., Hales, C. N., & Bleker, O. P. (1998). Glucose-tolerance in adults after prenatal exposure to famine. *The Lancet*, 351, 173–177.
- Raynaud, A., Meunier, N., Acquistapace, A., & Bombail, V. (2015). Chronic variable stress exposure in

- male Wistar rats affects the first step of olfactory detection. *Behavioural Brain Research*, 291, 36–45.
- Reisert, J., Bauer, P. J., Yau, K.-W., & Frings, S. (2003). The Ca-activated Cl Channel and its Control in Rat Olfactory Receptor Neurons. *Journal of General Physiology*, 122(3), 349–63.
- Ressler, K. J., Sullivan, S. L., & Buck, L. B. (1993). A zonal organization of odorant receptor gene expression in the olfactory epithelium. *Cell*, 73(3), 597–609. [http://doi.org/10.1016/0092-8674\(93\)90145-G](http://doi.org/10.1016/0092-8674(93)90145-G)
- Restrepo, D., Doucette, W., Whitesell, J. D., McTavish, T. S., & Salcedo, E. (2009). From the top down: flexible reading of a fragmented odor map. *Trends in Neurosciences*, 32(10), 525–531.
- Ribaroff, G. A., Wastnedge, E., Drake, A. J., Sharpe, R. M., & Chambers, T. J. G. (2017). Animal models of maternal high fat diet exposure and effects on metabolism in offspring: a meta-regression analysis. *Obesity Reviews*, 18(6), 673–686.
- Richardson, B. E., Vander Woude, E. a., Sudan, R., Thompson, J. S., & Leopold, D. a. (2004). Altered olfactory acuity in the morbidly obese. *Obesity Surgery*, 14(7), 967–969.
- Riera, C. E., & Dillin, A. (2016). Emerging role of sensory perception in aging and metabolism. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 1–10.
- Riera, C. E., Tsaousidou, E., Halloran, J., Follett, P., Hahn, O., Pereira, M. M. A., ... Dillin, A. (2017). The Sense of Smell Impacts Metabolic Health and Obesity. *Cell Metabolism*, 26(1), 198–211.e5.
- Rincel, M., Lépinay, A. L., Janthakhin, Y., Soudain, G., Yvon, S., Da Silva, S., ... Darnaudéry, M. (2017). Maternal high-fat diet and early life stress differentially modulate spine density and dendritic morphology in the medial prefrontal cortex of juvenile and adult rats. *Brain Structure and Function*, (October).
- Rivera, H. M., Christiansen, K. J., & Sullivan, E. L. (2015). The role of maternal obesity in the risk of neuropsychiatric disorders. *Frontiers in Neuroscience*, 9(MAY), 1–16.
- Rivière, S., Soubeyre, V., Jarriault, D., Molinas, A., Léger-Charnay, E., Desmoulins, L., ... Grosmaître, X. (2016). High Fructose Diet inducing diabetes rapidly impacts olfactory epithelium and behavior in mice. *Scientific Reports*, 6, 1–13.
- Rochefort, C., Gheusi, G., Vincent, J.-D., & Lledo, P.-M. (2002). Enriched odor exposure increases the number of newborn neurons in the adult olfactory bulb and improves odor memory. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 22(7), 2679–2689.
- Rochefort, C., & Lledo, P. M. (2005). Short-term survival of newborn neurons in the adult olfactory bulb after exposure to a complex odor environment. *European Journal of Neuroscience*, 22(11), 2863–2870.
- Roland, B., Jordan, R., Sosulski, D. L., Diodato, A., Fukunaga, I., Wickersham, I., ... Fleischmann, A. (2016). Massive normalization of olfactory bulb output in mice with a 'monoclonal nose.' *ELife*, 5(MAY2016), 1–25.
- Rolls, E. T., Burton, M. J., & Mora, F. (1980). Neurophysiological analysis of brain-stimulation reward in the monkey. *Brain Research*, 194, 339–357.
- Rolls, E. T., Murzi, E., Yaxley, S., Thorpe, S. J., & Simpson, S. J. (1986). Sensory-specific satiety: Food-specific reduction in responsiveness of ventral forebrain neurons after feeding in the monkey. *Brain Research*, 368(1), 79–86.
- Rolls, E. T., & Rolls, J. H. (1997). Olfactory sensory-specific satiety in humans. *Physiology and Behavior*, 61(3), 461–473.
- Romero-grimaldi, C., Gheusi, G., Lledo, P., & Estrada, C. (2006). Chronic inhibition of nitric oxide synthesis enhances both subventricular zone neurogenesis and olfactory learning in adult mice, 24(August), 2461–2470.
- Rooney, K., & Ozanne, S. E. (2011). Maternal over-nutrition and offspring obesity predisposition:

- Targets for preventative interventions. *International Journal of Obesity*, 35(7), 883–890.
- Root, C. M., Denny, C. A., Hen, R., & Axel, R. (2014). The participation of cortical amygdala in innate, odour-driven behaviour. *Nature*, 515(7526), 269–273.
- Rosen, J. B., Asok, A., & Chakraborty, T. (2015). The smell of fear: Innate threat of 2,5-dihydro-2,4,5-trimethylthiazoline, a single molecule component of a predator odor. *Frontiers in Neuroscience*, 9(AUG), 1–12.
- Rospars, J. P., Lánský, P., Duchamp-Viret, P., & Duchamp, A. (2000). Spiking frequency versus odorant concentration in olfactory receptor neurons. *BioSystems*, 58(1–3), 133–141.
- Rosselli-Austin, L., & Williams, J. (1990). Enriched neonatal odor exposure leads to increased numbers of olfactory bulb mitral and granule cells. *Developmental Brain Research*, 51(1), 135–137.
- Roth, T. L., & Sullivan, R. M. (2001). Endogenous opioids and their role in odor preference acquisition and consolidation following odor-shock conditioning in infant rats. *Developmental Psychobiology*, 39(3), 188–198.
- Roth, T. L., & Sullivan, R. M. (2003). Consolidation and expression of a shock-induced odor preference in rat pups is facilitated by opioids. *Physiology and Behavior*, 78(1), 135–142.
- Rother, E., Kuschewski, R., Alcazar, M. A. A., Oberthuer, A., Bae-Gartz, I., Vohlen, C., ... Dötsch, J. (2012). Hypothalamic JNK1 and IKK $\beta$  activation and impaired early postnatal glucose metabolism after maternal perinatal high-fat feeding. *Endocrinology*, 153(2), 770–781.
- Saben, J. L., Lindsey, F., Zhong, Y., Thakali, K., Badger, T. M., Andres, A., ... Shankar, K. (2014a). Maternal obesity is associated with a lipotoxic placental environment. *Placenta*, 35(3), 171–177.
- Saben, J. L., Bales, E. S., Jackman, M. R., Orlicky, D., MacLean, P. S., & McManaman, J. L. (2014b). Maternal obesity reduces milk lipid production in lactating mice by inhibiting acetyl-CoA carboxylase and impairing fatty acid synthesis. *PLoS ONE*, 9(5), 17–19.
- Saito, H., Chi, Q., Zhuang, H., Matsunami, H., & Mainland, J. D. (2009). Odor coding by a Mammalian receptor repertoire. *Science Signaling*, 2(60).
- Saito, H., Mimmack, M., Kishimoto, J., Keverne, E. B., & Emson, P. C. (1998). Expression of olfactory receptors, G-proteins and AxCAMs during the development and maturation of olfactory sensory neurons in the mouse. *Developmental Brain Research*, 110(1), 69–81.
- Sakano, H. (2010). Neural Map Formation in the Mouse Olfactory System. *Neuron*, 67(4), 530–542.
- Sakurai, T., Amemiya, A., Ishii, M., Matsuzaki, I., Chemelli, R. M., Tanaka, H., ... Bergsma, D. J. (1998). Orexins and orexin receptors: a family of hypothalamic neuropeptides and G protein-coupled receptors that regulate feeding behavior. *Cell*, 92, 573–585.
- Saraiva, L. R., Ibarra-Soria, X., Khan, M., Omura, M., Scialdone, A., Mombaerts, P., ... Logan, D. W. (2015). Hierarchical deconstruction of mouse olfactory sensory neurons: From whole mucosa to single-cell RNA-seq. *Scientific Reports*, 5(December), 1–17.
- Sarret, P. (2000). Signalisation par les recepteurs membranaires couples aux proteines-g : etude fonctionnelle des recepteurs de la somatostatine et de la neurotensine. (Thèse)
- Sasaki, A., De Vega, W. C., St-Cyr, S., Pan, P., & McGowan, P. O. (2013). Perinatal high fat diet alters glucocorticoid signaling and anxiety behaviour in adulthood. *Neuroscience*, 240, 1–12.
- Sasaki, A., de Vega, W., Sivanathan, S., St-Cyr, S., & McGowan, P. (2014). Maternal high-fat diet alters anxiety behavior and glucocorticoid signaling in adolescent offspring. *Neuroscience*, 272, 92–101.
- Savigner, A., Duchamp-Viret, P., Grosmaître, X., Chaput, M., Garcia, S., Ma, M., & Palouzier-Paulignan, B. (2009). Modulation of spontaneous and odorant-evoked activity of rat olfactory sensory neurons by two anorectic peptides, insulin and leptin. *Journal of Neurophysiology*, 101(6), 2898–2906.

- Schaal, B., Coureaud, G., Langlois, D., Giniès, C., Sémon, E., & Perrier, G. (2003). Chemical and behavioural characterization of the rabbit mammary pheromone. *Nature*, 424(6944), 68–72.
- Schaal, B., Marlier, L., Soussignan, R., Nouzilly, F., Bourgogne, U. De, Picardet, R. A., ... Paris, F.-. (2000). Human fetuses learn odours from their pregnant mother's diet. *Chemical Senses*, 25, 729–737.
- Schafer, J. R., Kida, I., Xu, F., Rothman, D. L., & Hyder, F. (2006). Reproducibility of odor maps by fMRI in rodents. *NeuroImage*, 31(3), 1238–1246. h
- Schleicher, S., Boekhoff, I., Arriza, J., Lefkowitz, R. J., & Breer, H. (1993). A beta-adrenergic receptor kinase-like enzyme is involved in olfactory signal termination. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90(4), 1420–4.
- Schmid, A., Pyrski, M., Biel, M., Leinders-Zufall, T., & Zufall, F. (2010). Grueneberg ganglion neurons are finely tuned cold sensors. *Journal of Neuroscience*, 30(22), 7563–7568.
- Schneider, N. Y., Datiche, F., Wilson, D. A., Gigot, V., Thomas-Danguin, T., Ferreira, G., & Coureaud, G. (2016). Brain processing of a configural vs elemental odor mixture in the newborn rabbit. *Brain Structure and Function*, 221(5), 2527–2539.
- Schneider, R. A., & Wolf, S. (1955). Olfactory perception thresholds for citral utilizing a new type olfactorium. *Journal of Applied Physiology*, 8(3), 337.
- Schoenbaum, G., Chiba, a a, & Gallagher, M. (1999). Neural encoding in orbitofrontal cortex and basolateral amygdala during olfactory discrimination learning. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 19(5), 1876–1884.
- Schoenbaum, G., & Roesch, M. (2005). Orbitofrontal cortex, associative learning, and expectancies. *Neuron*, 47(5), 633–636.
- Schwarzenbacher, K., Fleischer, J., & Breer, H. (2005). Formation and maturation of olfactory cilia monitored by odorant receptor-specific antibodies. *Histochemistry and Cell Biology*, 123(4–5), 419–428.
- Schwob, J. E. (2002). Neural regeneration and the peripheral olfactory system. *The Anatomical Record*, 269(1), 33–49.
- Schwob, J. E., & Price, J. L. (1984). The development of axonal connections in the central olfactory system of rats. *The Journal of Comparative Neurology*, 223(2), 177–202.
- Scott, J. W., McBride, R. L., & Schneider, S. P. (1980). The organization of projections from the olfactory bulb to the piriform cortex and olfactory tubercle in the rat. *The Journal of Comparative Neurology*, 194(3), 519–534.
- Seebungkert, B., & Lynch, J. W. (2002). Effects of polyunsaturated fatty acids on voltage-gated K<sup>+</sup> and Na<sup>+</sup> channels in rat olfactory receptor neurons. *European Journal of Neuroscience*, 16(11), 2085–2094.
- Sevelinges, Y., Desgranges, B., & Ferreira, G. (2009). The basolateral amygdala is necessary for the encoding and the expression of odor memory. *Learning and Memory*, 16(4), 235–242.
- Sevelinges, Y., Gervais, R., Messaoudi, B., Granjon, L., & Mouly, A.-M. (2004). Olfactory fear conditioning induces field potential potentiation in rat olfactory cortex and amygdala. *Learning and Memory*, 11(6), 761–769.
- Shaikh, S. R., Rockett, B. D., Salameh, M., & Carraway, K. (2009). Docosahexaenoic acid modifies the clustering and size of lipid rafts and the lateral organization and surface expression of MHC class I of EL4 cells. *The Journal of Nutrition*, 139(9), 1632–1639.
- Shide, D. J., & Blass, E. M. (1991). Opioid mediation of odor preferences induced by sugar and fat in 6-day-old rats. *Physiology and Behavior*, 50(5), 961–966.
- Shioda, S., Funahashi, H., Nakajo, S., Yada, T., Maruta, O., & Nakai, Y. (1998). Immunohistochemical localization of leptin receptor in the rat brain. *Neuroscience Letters*, 243(1–3), 41–44.

- Simerly, R. B. (2008). Hypothalamic substrates of metabolic imprinting. *Physiology and Behavior*, 94(1), 79–89.
- Sinding, C., Kemper, E., Spornraft-Ragaller, P., & Hummel, T. (2013). Decreased perception of boureeonal may be linked to male idiopathic infertility. *Chemical Senses*, 38(5), 439–445.
- Sinnarajah, S., Dessauer, C. W., Srikumar, D., Chen, J., Yuen, J., Yilma, S., ... Kehrl, J. H. (2001). RGS2 regulates signal transduction in olfactory neurons by attenuating activation of adenylyl cyclase III. *Nature*, 409(6823), 1051–5.
- Siopi, E., Denizet, M., Gabellec, M., Chaumont, F. De, Guilloux, J., & Lledo, P. (2016). Anxiety- and depression-like states lead to pronounced olfactory deficits and impaired adult neurogenesis in mice. *The Journal of Neuroscience*, 36(2), 518–531.
- Skrandies, W., & Zschieschang, R. (2015). Olfactory and gustatory functions and its relation to body weight. *Physiology and Behavior*, 142, 1–4.
- Smart, I. H. (1971). Location and orientation of mitotic figures in the developing mouse olfactory epithelium. *Journal of Anatomy*, 109(Pt 2), 243–51.
- Snoddy, A. M., Heckathorn, D., & Tessel, R. E. (1985). Cold-restraint stress and urinary endogenous beta-phenylethylamine excretion in rats. *Pharmacol Biochem Behav*, 22(3), 497–500.
- Soria-gómez, E., Bellocchio, L., Reguero, L., Lepousez, G., Martin, C., Bendahmane, M., ... Marsicano, G. (2014). The endocannabinoid system controls food intake via olfactory processes. *Nature Publishing Group*, 17(3), 407–415.
- Spehr, M. (2003). Identification of a Testicular Odorant Receptor Mediating Human Sperm Chemotaxis. *Science*, 299(5615), 2054–2058.
- Spors, H. (2006). Temporal Dynamics and Latency Patterns of Receptor Neuron Input to the Olfactory Bulb. *Journal of Neuroscience*, 26(4), 1247–1259.
- St. John, J. A., Clarris, H. J., & Key, B. (2002). Multiple axon guidance cues establish the olfactory topographic map: How do these cues interact? *International Journal of Developmental Biology*, 46(4 SPEC.), 639–647.
- St John, J. A., & Key, B. (2001). Chemically and morphologically identifiable glomeruli in the rat olfactory bulb. *Journal of Comparative Neurology*, 436(4), 497–507.
- Stachowiak, E. K., Srinivasan, M., Stachowiak, M. K., & Patel, M. S. (2013). Maternal obesity induced by a high fat diet causes altered cellular development in fetal brains suggestive of a predisposition of offspring to neurological disorders in later life. *Metabolic Brain Disease*, 28(4), 721–725.
- Stafford, L. D., & Welbeck, K. (2011). High hunger state increases olfactory sensitivity to neutral but not food odors. *Chemical Senses*, 36(2), 189–98.
- Stafford, L. D., & Whittle, A. (2015). Obese individuals have higher preference and sensitivity to odor of chocolate. *Chemical Senses*, 40(4), 279–284.
- Stevenson, R. J. (2010). An Initial Evaluation of the Functions of Human Olfaction. *Chemical Senses*, 35, 3–20.
- Stewart, J. E., Feinle-Bisset, C., Golding, M., Delahunty, C., Clifton, P. M., & Keast, R. S. J. (2010). Oral sensitivity to fatty acids, food consumption and BMI in human subjects. *British Journal of Nutrition*, 104(1), 145–152.
- Strotmann, J., Levai, O., Fleischer, J., Schwarzenbacher, K., & Breer, H. (2004). Olfactory Receptor Proteins in Axonal Processes of Chemosensory Neurons. *The Journal of Neuroscience*, 24(35), 7754–7761.
- Strowbridge, B. W. (2009). Role of cortical feedback in regulating inhibitory microcircuits. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1170, 270–274.

- Su, C.-Y., Menuz, K., & Carlson, J. R. (2009). Olfactory Perception: Receptors, Cells, and Circuits. *Cell*, 139(1), 45–59.
- Sullivan, E. L., Nousen, E. K., & Chamlou, K. A. (2014). Maternal high fat diet consumption during the perinatal period programs offspring behavior. *Physiology and Behavior*, 123, 236–242.
- Sullivan, E. L., Riper, K. M., Lockard, R., & Valleau, J. C. (2015). Maternal high-fat diet programming of the neuroendocrine system and behavior. *Hormones and Behavior*, 76, 153–161.
- Sullivan, R. M., Zyzak, D. R., Skierkowski, P., & Wilson, D. A. (1992). The role of olfactory bulb norepinephrine in early olfactory learning. *Developmental Brain Research*, 70(2), 279–282.
- Sultan, S., Mandairon, N., Kermen, F., Garcia, S., Sacquet, J., & Didier, a. (2010). Learning-dependent neurogenesis in the olfactory bulb determines long-term olfactory memory. *The FASEB Journal : Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 24(7), 2355–2363.
- Sumner, J. B., & Noback, C. V. (1924). The estimation of sugar in diabetic urine, using dinitrosalicylic acid. *The Journal of Biological Chemistry*, 62(2), 287–290.
- Sun, B., Purcell, R. H., Terrillion, C. E., Yan, J., Moran, T. H., & Tamashiro, K. L. K. (2012). Maternal High-Fat Diet During Gestation or Suckling Differentially Affects Offspring Leptin Sensitivity and Obesity. *Diabetes*, 61(11), 2833–2841.
- Suzuki, Y., Takeda, M., & Farbman, A. I. (1996). Supporting cells as phagocytes in the olfactory epithelium after bulbectomy. *Journal of Comparative Neurology*, 376(4), 509–517.
- Takahashi, L. K., Barr, G. A., & Hospital, C. (2014). Olfactory systems and neural circuits that modulate predator odor fear, 8(March), 1–13.
- Takase, K., Tsuneoka, Y., Oda, S., Kuroda, M., & Funato, H. (2016). High-fat diet feeding alters olfactory-, social-, and reward-related behaviors of mice independent of obesity. *Obesity*, 24(4).
- Thanos, P. K., Robison, L. S., Robinson, J. K., Michaelides, M., Wang, G. J., & Volkow, N. D. (2013). Obese rats with deficient leptin signaling exhibit heightened sensitivity to olfactory food cues. *Synapse*, 67(4), 171–178.
- Thiebaud, N., Johnson, M. C., Butler, J. L., Bell, G. A., Ferguson, K. L., Fadool, A. R., ... Fadool, D. A. (2014). Hyperlipidemic diet causes loss of olfactory sensory neurons, reduces olfactory discrimination, and disrupts odor-reversal learning. *The Journal of Neuroscience*, 34(20), 6970–84.
- Thierry, M., Pasquis, B., Acar, N., Grégoire, S., Febvret, V., Buteau, B. N., ... Bretillon, L. (2014). Metabolic syndrome triggered by high-fructose diet favors choroidal neovascularization and impairs retinal light sensitivity in the rat. *PLoS ONE*, 9(11), 1–13.
- Thommesen, G., & Doving, K. B. (1977). Spatial distribution of the EOG in the rat; a variation with odour quality. *Acta Physiologica Scandinavica*, 99(3), 270–280.
- Tian, H., & Ma, M. (2004). Molecular organization of the olfactory septal organ. *The Journal of Neuroscience*, 24(38), 8383–90.
- Tian, H., & Ma, M. (2008). Differential development of odorant receptor expression patterns in the olfactory epithelium: a quantitative analysis in the mouse septal organ. *Developmental Neurobiology*, 68(4), 476–486.
- Todrank, J., Heth, G., & Restrepo, D. (2011). Effects of in utero odorant exposure on neuroanatomical development of the olfactory bulb and odour preferences. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 278(1714), 1949–1955.
- Toida, K., Kosaka, K., Heizmann, C. W., & Kosaka, T. (1994). Synaptic contacts between mitral/tufted cells and GABAergic neurons containing calcium-binding protein parvalbumin in the rat olfactory bulb, with special reference to reciprocal synapses between them. *Brain Research*, 650(2), 347–352. [http://doi.org/10.1016/0006-8993\(94\)91804-X](http://doi.org/10.1016/0006-8993(94)91804-X)

- Tong, J., Mannea, E., Aimé, P., Pfluger, P. T., Yi, C., Castaneda, T. R., ... Tschöp, M. H. (2011). Ghrelin enhances olfactory sensitivity and exploratory sniffing in rodents and humans. *The Journal of Neuroscience*, 31(15), 5841–6.
- Touhara, K., Sengoku, S., Inaki, K., Tsuboi, a, Hirono, J., Sato, T., ... Haga, T. (1999). Functional identification and reconstitution of an odorant receptor in single olfactory neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(7), 4040–4045.
- Tozuka, Y., Kumon, M., Wada, E., Onodera, M., Mochizuki, H., & Wada, K. (2010). Maternal obesity impairs hippocampal BDNF production and spatial learning performance in young mouse offspring. *Neurochemistry International*, 57(3), 235–247.
- Tozuka, Y., Wada, E., & Wada, K. (2009). Diet-induced obesity in female mice leads to peroxidized lipid accumulations and impairment of hippocampal neurogenesis during the early life of their offspring. *The FASEB Journal*, 23(6), 1920–1934.
- Trellakis, S., Tagay, S., Fischer, C., Rydleuskaya, A., Scherag, A., Bruderek, K., Schlegl, S., Greve, J., Canbay, A.E., Lang, S. & Brandau, S. Ghrelin, leptin and adiponectin as possible predictors of the hedonic value of odors. *Regulatory peptides*, 167(1), 112-7.
- Tsou, K., Brown, S., Sanudo-Pena, M. C., Mackie, K., & Walker, J. M. (1998). Immunohistochemical distribution of cannabinoid CB1 receptors in the rat central nervous system. *Neuroscience*, 83(2), 393–411.
- Tsujino, N., & Sakurai, T. (2009). Orexin/hypocretin: a neuropeptide at the interface of sleep, energy homeostasis, and reward system. *Pharmacol Rev*, 61(2), 162–176.
- Tucker, K., Cavallin, M. A., Jean-Baptiste, P., Biju, K. C., Overton, J. M., Pedarzani, P., & Fadool, D. A. (2010). The olfactory bulb: a metabolic sensor of brain insulin and glucose concentrations via a voltage-gated potassium channel. *Results and Problems in Cell Differentiation*, 52, 147–157.
- Tucker, K., Cho, S., Thiebaud, N., Henderson, M. X., & Fadool, D. A. (2013). Glucose sensitivity of mouse olfactory bulb neurons is conveyed by a voltage-gated potassium channel. *The Journal of Physiology*, 591(Pt 10), 2541–61.
- Tucker, K. R., Godbey, S. J., Thiebaud, N., & Fadool, D. A. (2012a). Olfactory ability and object memory in three mouse models of varying body weight, metabolic hormones, and adiposity. *Physiology & Behavior*, 107(3), 424–432.
- Tucker, K. R., Overton, J. M., & Fadool, D. A. (2012b). Diet-induced obesity resistance of *Kv1.3*<sup>-/-</sup> mice is olfactory bulb dependent. *Journal of Neuroendocrinology*, 24(8), 1087–1095.
- Udagawa, J., Hatta, T., Otani, H., & Naora, H. (2000). Expression of the long form of leptin receptor (Ob-Rb) mRNA in the brain of mouse embryos and newborn mice. *Brain Research*, 868(2), 251–258.
- Valle-Leija, P., Blanco-Hernández, E., Drucker-Colín, R., Gutiérrez-Ospina, G., & Vidaltamayo, R. (2012). Supernumerary formation of olfactory glomeruli induced by chronic odorant exposure: a constructivist expression of neural plasticity. *PLoS One*, 7(4).
- Vassar, R., Ngai, J., & Axel, R. (1993). Spatial segregation of odorant receptor expression in the mammalian olfactory epithelium. *Cell*, 74(2), 309–318.
- Vaz, R. P., Cardoso, A., Serrão, P., Pereira, P. A., & Madeira, M. D. (2018). Chronic stress leads to long-lasting deficits in olfactory-guided behaviors, and to neuroplastic changes in the nucleus of the lateral olfactory tract. *Hormones and Behavior*, 98(November 2017), 130–144.
- Vogt, M. C., Paeger, L., Hess, S., Steculorum, S. M., Awazawa, M., Hampel, B., ... Bru, J. C. (2014). Neonatal insulin action impairs hypothalamic neurocircuit formation in response to maternal high-fat feeding. *Cell*, 156, 495–509.
- Wachowiak, M., & Cohen, L. B. (2001). Representation of odorants by receptor neuron input to the mouse olfactory bulb. *Neuron*, 32(4), 723–735.
- Wacker, D. W., Engelmann, M., Tobin, V. A., Meddle, S. L., & Ludwig, M. (2011). Vasopressin and

- social odor processing in the olfactory bulb and anterior olfactory nucleus. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1220(1), 106–116.
- Wahlig, J. L., Bales, E. S., Jackman, M. R., Johnson, G. C., McManaman, J. L., & MacLean, P. S. (2012). Impact of high-fat diet and obesity on energy balance and fuel utilization during the metabolic challenge of lactation. *Obesity*, 20(1), 65–75.
- Warner, M. J., & Ozanne, S. E. (2010). Mechanisms involved in the developmental programming of adulthood disease, 347, 333–347.
- Weinstock, R. S., Wright, H. N., & Smith, D. U. (1993). Olfactory dysfunction in diabetes mellitus. *Physiology & Behavior*, 53(1), 17–21.
- Wesson, D. W., Donahou, T. N., Johnson, M. O., & Wachowiak, M. (2008). Sniffing behavior of mice during performance in odor-guided tasks. *Chemical Senses*, 33(7), 581–596.
- Wesson, D. W., & Wilson, D. A. (2011). Sniffing out the contributions of the olfactory tubercle to the sense of smell: Hedonics, sensory integration, and more? *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 35(3), 655–668.
- Whitman, M. C., & Greer, C. A. (2007). Adult-generated neurons exhibit diverse developmental fates. *Developmental Neurobiology*, 67(8), 1079–93.
- Whitman, M. C., & Greer, C. A. (2007). Synaptic Integration of Adult-Generated Olfactory Bulb Granule Cells: Basal Axodendritic Centrifugal Input Precedes Apical Dendrodendritic Local Circuits. *Journal of Neuroscience*, 27(37), 9951–9961.
- Whitman, M. C., & Greer, C. A. (2009). Adult neurogenesis and the olfactory system. *Progress in Neurobiology*, 89(2), 162–175.
- WHO. (2010). Global status report on noncommunicable diseases.
- WHO. (2015). WHO Guideline: Sugars intake for adults and children.
- Williams, L., Yoshinori, S., Vuguin, P. M., & Charron, M. J. (2014). Animal models of in utero exposure to a high fat diet: a review. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1842(3), 507–519.
- Wilson, D. A., & Sullivan, R. M. (2011). Cortical processing of odor objects. *Neuron*, 72(4), 506–519.
- Wilson, D. A., Sullivan, R. M., & Leon, M. (1985). Odor familiarity alters mitral cell response in the olfactory bulb of neonatal rats. *Developmental Brain Research*, 22(2), 314–317.
- Winner, B., Cooper-Kuhn, C. M., Aigner, R., Winkler, J., & Kuhn, H. G. (2002). Long-term survival and cell death of newly generated neurons in the adult rat olfactory bulb. *European Journal of Neuroscience*, 16(9), 1681–1689.
- Woo, C. C., & Leon, M. (1987). Sensitive period for neural and behavioral response development to learned odors. *Developmental Brain Research*, 36(2), 309–313.
- Woods, S. C., & D'Alessio, D. A. (2008). Central control of body weight and appetite. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 93(11 SUPPL. 1), 37–50.
- Wren, A. M., Seal, L. J., Cohen, M. A., Brynes, A. E., Frost, G. S., Murphy, K. G., ... Bloom, S. R. (2001). Ghrelin enhances appetite and increases food intake in humans. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 86(12), 5992–5995.
- Wright, T. M., Fone, K. C. F., Langley-Evans, S. C., & Voigt, J. P. W. (2011). Exposure to maternal consumption of cafeteria diet during the lactation period programmes feeding behaviour in the rat. *International Journal of Developmental Neuroscience*, 29(8), 785–793.
- Wymann, M. P., & Schneider, R. (2008). Lipid signalling in disease. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 9, 162.
- Wysocki, C. J., & Gilbert, A. N. (1989). National Geographic Smell Survey: Effects of Age Are Heterogenous. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 561(1), 12–28.

- Wyss, J. (1981). An autoradiographic study of the efferent connections of the entorhinal cortex in the rat. *The Journal of Comparative Neurology*, 199(4), 495–512.
- Xiong, W., & Chen, W. R. (2002). Dynamic gating of spike propagation in the mitral cell lateral dendrites. *Neuron*, 34(1), 115–126.
- Xu, F., Liu, N., Kida, I., Rothman, D. L., Hyder, F., & Shepherd, G. M. (2003). Odor maps of aldehydes and esters revealed by functional MRI in the glomerular layer of the mouse olfactory bulb. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(19), 11029–11034.
- Xu, F., Schaefer, M., Kida, I., Schafer, J., Liu, N., Rothman, D. L., ... Shepherd, G. M. (2005). Simultaneous activation of mouse main and accessory olfactory bulbs by odors or pheromones. *Journal of Comparative Neurology*, 489(4), 491–500.
- Xu, W., & Wilson, D. A. (2012). Odor-evoked activity in the mouse lateral entorhinal cortex. *Neuroscience*, 223, 12–20.
- Yan, C., Zhao, a Z., Bentley, J. K., Loughney, K., Ferguson, K., & Beavo, J. a. (1995). Molecular cloning and characterization of a calmodulin-dependent phosphodiesterase enriched in olfactory sensory neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(21), 9677–9681.
- Yan, Z., Tan, J., Qin, C., Lu, Y., Ding, C., & Luo, M. (2008). Precise circuitry links bilaterally symmetric olfactory maps. *Neuron*, 58(4), 613–624.
- Yang, M., & Crawley, J. N. (2009). Simple behavioral assessment of mouse olfaction. *Current Protocols Neuroscience*, 1–14.
- Yang, Y., Wang, X. -b., Frerking, M., & Zhou, Q. (2008). Spine expansion and stabilization associated with long-term potentiation. *Journal of Neuroscience*, 28(22), 5740–5751.
- Yang, Z., & Huffman, S. L. (2013). Nutrition in pregnancy and early childhood and associations with obesity in developing countries. *Maternal and Child Nutrition*, 9(SUPPL. 1), 105–119.
- Yokoi, M., Mori, K., & Nakanishi, S. (1995). Refinement of odor molecule tuning by dendrodendritic synaptic inhibition in the olfactory bulb. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92(8), 3371–3375.
- Yokomizo, H., Inoguchi, T., Sonoda, N., Sakaki, Y., Maeda, Y., Inoue, T., ... Takayanagi, R. (2014). Maternal high-fat diet induces insulin resistance and deterioration of pancreatic beta-cell function in adult offspring with sex differences in mice. *AJP: Endocrinology and Metabolism*, (42), 1163–1175.
- Youngentob, S. L. (2005). A method for the rapid automated assessment of olfactory function. *Chemical Senses*, 30(3), 219–229.
- Yu, A. S., Hirayama, B. A., Timbol, G., Liu, J., Basarah, E., Kepe, V., ... Barrio, J. R. (2010). Functional expression of SGLTs in rat brain. *AJP: Cell Physiology*, 299(6), C1277–C1284.
- Yu, H., Dong, S., Gao, L., Li, L., Xi, Y., Ma, W., & Yuan, L. (2015). Global DNA methylation was changed by a maternal high-lipid, high-energy diet during gestation and lactation in male adult mice liver. *British Journal of Nutrition*, 113, 1032–1039.
- Zald, D. H., & Pardo, J. V. (1997). Emotion, olfaction, and the human amygdala: Amygdala activation during aversive olfactory stimulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94(8), 4119–4124.
- Zaqout, S., & Kaindl, A. M. (2016). Golgi-Cox Staining Step by Step. *Frontiers in Neuroanatomy*, 10(March), 1–7.
- Zelano, C., Montag, J., Johnson, B., Khan, R., & Sobel, N. (2007). Dissociated representations of irritation and valence in human primary olfactory cortex. *Journal of Neurophysiology*, 97(3), 1969–1976.
- Zhang, X., & Firestein, S. (2002). The olfactory receptor gene superfamily of the mouse. *Nature*

Neuroscience, 5(2), 124–133.

Zheng, J., Xiao, X., Zhang, Q., Yu, M., Xu, J., & Wang, Z. (2014). Maternal high-fat diet modulates hepatic glucose, lipid homeostasis and gene expression in the PPAR pathway in the early life of offspring. *International Journal of Molecular Sciences*, 15, 14967–14983.

Zilstorff-Pedersen, K. (1955). Olfactory threshold determinations in relation to food intake. *Acta Oto-Laryngologica*, 45(1), 86.

Zou, D. J., Chesler, A., & Firestein, S. (2009). How the olfactory bulb got its glomeruli: A just so story? *Nature Reviews Neuroscience*, 10(8), 611–618.

Zou, D. J., Feinstein, P., Rivers, A. L., Mathews, G. A., Kim, A., Greer, C. A., ... Firestein, S. (2004). Postnatal refinement of peripheral olfactory projections. *Science*, 304(5679), 1976–1979.

Zufall, F., & Leinders-Zufall, T. (2000). The cellular and molecular basis of odor adaptation. *Chemical Senses*, 25(4), 473–481.

# Annexe 1 : Manuscrit soumis dans le journal *Psychoneuroendocrinology*

---

**Title:** Maternal high fat high sugar diet disrupts olfactory behavior but not mucosa sensitivity in the offspring

**Authors:** Laëtitia Merle, Ophélie Person, Pierre Bonnet, Stéphane Grégoire, Vanessa Soubeyre, Xavier Grosmaître, David Jarriault\*

**Affiliation:** Centre des Sciences du Goût et de l'Alimentation, AgroSup Dijon, CNRS, INRA, Université Bourgogne Franche-Comté, 9E boulevard Jeanne d'Arc, F-21000 Dijon, France.

\*corresponding author: Centre des Sciences du Goût et de l'Alimentation, AgroSup Dijon, CNRS, INRA, Université Bourgogne Franche-Comté, 9E boulevard Jeanne d'Arc, F-21000 Dijon, France. Email address: david.jarriault@inra.fr

## **Abstract:**

The influence of maternal diet on progeny's metabolic health has been thoroughly investigated, but the impact on sensory systems remains unexplored. Neurons of the olfactory system start to develop during the embryonic life and carry on their maturation after birth. Besides, these neurons are under metabolic influences, and it has recently been shown that adult mice exposed to an obesogenic or diabetogenic diet display reduced olfactory abilities. However, whether or not olfactory function is affected by the perinatal nutritional environment is unknown.

Here we investigated the effect of a high fat high sucrose (HFHS) maternal diet (46% of total energy brought by lipids, 26.6% by sucrose) on progeny's olfactory system in mice.

In male offspring at weaning stage, maternal HFHS diet induced overweight and increased gonadal fat, associated with hyperleptinemia. The progeny of HFHS diet fed dams showed reduced sniffing behavior in the presence of low doses of phenylethanol (an attractive odorant for mice), compared to the progeny of standard diet fed dams. Furthermore, they exhibited increased time to retrieve a piece of breakfast cereals hidden beneath the bedding in a buried food test. Meanwhile, electroolfactogram recordings revealed no change in the sensitivity of olfactory mucosa. mRNA levels for elements of the olfactory transduction cascade were not affected either.

Our results demonstrate that maternal HFHS diet during gestation and lactation strongly modulates olfactory perception in the offspring, without impairing odor detection by the olfactory epithelium. Maternal HFHS diet starting two months before gestation did not induce additional impairments in progeny.

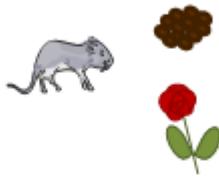
## Graphical abstract:

### Perinatal diet

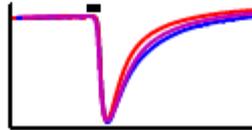


High fat high  
sucrose diet

### 3 week-old progeny



Disrupted olfactory  
behavior



Normal response to  
odorants in olfactory  
mucosa

## Highlights

- Perinatal high fat high sucrose (HFHS) diet decreased olfactory perception at weaning stage
- Perinatal HFHS diet had no impact on olfactory mucosa sensitivity
- Perinatal HFHS diet induced overweight, increased visceral fat and enhanced circulating leptin
- Additional pre-gestational HFHS diet did not exacerbate the impact on pups' olfactory system

**Keywords:** maternal diet, olfactory behavior, plethysmography, electro-olfactogram, olfactory mucosa, weaning

## 1. INTRODUCTION

Current eating behaviors involve high intake of fat and sugar. This type of diet, associated with sedentary lifestyle, increases the risk of developing obesity and metabolic diseases (Andersen, 2000). According to the World Health Organization (WHO), 39 % of worldwide adults were overweight and 13 % were obese in 2016. Women of childbearing age do not make an exception. The prevalence of overweight and obesity among pregnant women has reached more than 20 % (Lu et al., 2001).

In the early 1990's, Barker and collaborators raised the idea that major disorders in adults, such as obesity, stroke and cardiovascular diseases, might originate from the environment experienced *in utero* additionally to lifestyle, feeding habits and genetic factors (Barker, 1990). The concept of the developmental origins of health and disease relies on fetal programming mechanisms. Fetal tissues and organs are able to adapt to the early nutritional environment throughout their development (Barnes and Ozanne, 2011). In mammals, maternal diet before conception and during gestation influences the intra-uterine environment. Maternal diet also determines the milk composition and therefore the nutritional intake of newborns. As a result, maternal diet and subsequent maternal obesity are likely to modify the perinatal nutritional environment and consequently the susceptibility of progeny to develop diseases in adulthood. Numerous reviews highlight the relationships between maternal metabolic state and diet and the risk for the offspring to develop metabolic syndrome (Ribaroff et al., 2017; Williams et al., 2014), cardiovascular diseases (Dong et al., 2013) and behavioral disorders (Sullivan et al., 2015). However, the potential link between maternal diet and progeny's sensory abilities remains unexplored.

Acute senses are essential for individuals to survive and reproduce in their environment. Olfaction is especially involved in social interactions, avoiding predators and feeding. Odorant molecules are detected in the nasal cavity by olfactory sensory neurons (OSNs) in the olfactory mucosa (OM). OSNs convert the chemical stimulation into an electrical signal sent to the olfactory bulb (OB) and other brain structures. The olfactory system develops during embryonic life and pursues its maturation after birth. All the elements composing the olfactory system are thus likely to be affected by maternal diet. In addition, the olfactory system is modulated by metabolic peptides and hormones (Palouzier-Paulignan et al., 2012). Among these actors, insulin and leptin, two major metabolic hormones exerting an anorexigenic effect, can modulate the electrical activity of OSNs (Savigner et al., 2009) and decrease olfactory detection abilities in rodents (Aimé et al., 2012; Getchell et al., 2006; Julliard et al., 2007). Conversely, orexigenic factors such as orexins, ghrelin and neuropeptide Y (NPY) increase odorant detection and sniffing (Julliard et al., 2007; Negroni et al., 2012; Prud'homme et al., 2009; Tong et al., 2011). Because maternal diet can lead to metabolic disturbances in the offspring, their blood levels of metabolic hormones can be modified and at the root of olfactory defects. Besides, both a hyperlipidemic diet generating metabolic syndrome and a high fructose diet inducing diabetes caused anatomical and functional changes in the OM, such as a decrease in electrophysiological responses to odorants, as well as behavioral alterations (Rivière et al., 2016; Thiebaud et al., 2014).

We hypothesize that perinatal exposure to fat and sugar could impair olfaction in young mice. The present study aimed to investigate the impact of a High Fat High Sugar (HFHS) diet administered to females, from the onset of gestation or two months before and until the end of lactation, on their offspring's olfactory behavior and olfactory peripheral system. We first studied dam's ability to breastfeed, maternal milk composition and the metabolic phenotype of the 3-week old offspring. Maternal HFHS diet induced changes in milk fatty acids composition, and overweight, increased visceral adiposity as well as higher blood leptin levels in progeny. Monitoring the sniffing behavior of the weaned progeny using a plethysmograph showed a reduction in their response to low concentrations of an attractive odorant (phenylethanol, PEA). Moreover, HFHS progenies were slower to retrieve a food item using olfactory cues in a buried food test. When investigating pups' OM properties, electroolfactogram (EOG) recordings and gene expression analyses for constituents of the olfactory transduction cascade revealed no impact of maternal HFHS. Our results show that

maternal diet did substantially disrupt olfactory behavior of the offspring and suggest alterations in central structures rather than in peripheral olfactory system.

## **2. MATERIALS AND METHODS**

### **2.1. Animals, diets and experimental design**

Gene-targeted *SR1-IRES-tauGFP* mice, expressing the green fluorescent protein under the promoter of the *sr1 (Olfir-124)* odorant receptor gene (Grosmaître et al., 2009), were used in all experiments. Mice were housed 2 per cage with food and water *ad libitum*, under constant conditions of temperature and humidity in a 12h light/12h dark inverted cycle. As illustrated on **Supplementary figure 1**, female mice were placed on a standard diet (SD) or a HFHS diet (Safe, **Supplementary Table 1**) during a pre-conception period of 8 weeks. One age-matched male was introduced in each cage to mate with the 2 females, removed one week before expected births, and females were housed individually for the remaining time. One group of mice under SD and all mice under HFHS diet were maintained on their respective diets throughout gestation and lactation (respectively *CTRL* and *HFHS 8w + gest-lact* groups). The other group of females under SD received the HFHS diet from mating to weaning (*HFHS gest-lact* group). One day after birth, litters were standardized (5 to 7 pups per litter) to ensure comparable metabolic demands during lactation. Offspring were weaned on postnatal day (PND) 19 to 24 depending on the experiments. Dam's body weight and food intake were monitored twice a week during the whole procedure (**Supplementary figures 2 and 3**).

All experiments were conducted in accordance with the guidelines of the European Community for the use and care of laboratory animals (2010/63/EU) and resulting French regulations. Accordingly, all experimental protocols were approved by the French Ministry of Higher Education and Research (reference 01286.02).

### **2.2. Evaluation of lactation and milk composition analysis**

Lactation ability was evaluated at day 10 of lactation (L10). Litters were separated from their mother for 4h while kept warm on a temperature-controlled surface. Litters were then weighted and placed back in their mother's cage, and weighted again 2 hours later. The pups' milk consumption, assessed by the pups' weight gain during the two hour-period, represented the milk production of the dam.

Milk collection was also performed at L10 on another set of dams. As above, the litter was separated from the mother for 4h. Dams were anesthetized via intraperitoneal (i.p.) injection of Ketamine-Xylazine (70-14 mg/kg, Sigma-Aldrich). After an i.p. injection of oxytocin (100 µL, Intervet, Unterschleissheim, Germany) to induce milk let down, mice were milked using a glass pipette with an inflating bulb (Depeters and Hovey, 2009). Milk samples were stored at -80°C until analysis for lipid, protein and sugar composition.

Lipids were extracted according to the Folch method and analyzed using gas chromatography as described elsewhere (Thierry et al., 2014). Proteins were measured with DC Protein assay (Bio-Rad) following manufacturer recommendations. Lactose was measured via colorimetric assay using 3,5-dinitrosalicylic acid (DNS), an aromatic compound that reacts with reducing sugars upon the application of alkaline conditions and heat to form 3-amino-5-nitrosalicylic acid, which strongly absorbs light at 540 nm (Sumner and Noback, 1924). DNS reagent was prepared in distilled water as follows: 43.2 mM DNS (Alfa Aesar), 1.06 M potassium sodium tartrate (Rochelle salt, C<sub>4</sub>H<sub>4</sub>KNaO<sub>6</sub>, MP Biomedicals), 4% v/v sodium hydroxide (NaOH 30%, RP normapur, Prolabo). 20 µL of DNS reagent was added to 30 µL of 100 fold diluted milk samples or standard lactose solutions (0-500 µg/mL) and mixtures were incubated at 100°C for 5 min. After cooling on iced water, 150 µL of distilled water was added and absorbance was read at 540 nm.

### **2.3. Metabolic features of the offspring**

Litters were weighted on PND 1, and individual weight was followed twice a week during lactation. At weaning, blood was collected from the tail vein without anesthesia and centrifuged to obtain serum samples. Leptin serum levels were determined using a Mouse

Leptin ELISA Kit (Crystal Chem, #90030). Mice were dazed with isoflurane inhalation and sacrificed by decapitation to collect and weight the epididymal fat pad.

Tolerance to glucose was assessed in pups fasted for 5h by i.p. glucose tolerance test (ipGTT) as in (Bowe et al., 2014). Glucose i.p. injection (2g/kg body weight) was performed and glycaemia was measured using an Accu-Chek Performa glucometer (Roche) from blood collected from the tail vein before and 15, 30, 45, 60, 90, 120 minutes after glucose injection.

## 2.4. Behavioral experiments

### 2.4.1. Buried food test

Global olfactory acuity was assessed in male offspring using a buried food test, which relies on mice natural tendency to use olfactory cues for foraging. We adapted the protocol from Yang and Crowley (Yang and Crowley, 2009) to be suitable for young mice. Chocolate breakfast cereals (Crunch®, Nestlé) were used as food stimulus. Animals were habituated to cereals and test cages (conventional mouse cages (33x19x13 cm) filled with 6 cm of bedding) on three consecutive days before the actual test. We controlled that every mouse ate cereals at least one time during the whole habituation process. On test day, male pups were weaned and kept without food for 5h. Animals were tested for 3 consecutive trials separated by a 3-minute rest time. During the first trial, a piece a cereal was placed on the surface bedding at one randomly chosen spot (out of 8), and the mouse was introduced in the center of the cage. The time to reach and start eating the cereal was measured with a manual timer and used to assess mice motivation to reach a food item. Mice were prevented from eating the entire cereal to avoid satiation. The two remaining trials were performed the same way, except that the cereal was buried beneath 2 cm of bedding. Test ended once either the animal found the cereal or did not achieve to find it within 10 minutes. The shortest time to retrieve and eat the cereal between the two trials was used to assess olfactory performance.

To ensure that times of retrieval were due to pups' olfactory abilities and not to changes in exploratory and digging behaviors, we performed a behavioral observation in another set of pups. As above, animals were habituated to cereals, fasted for 5h on test day and the first trial with the cereal on the surface bedding was done. After a 3-minute rest time, the animals were introduced again in the cage without any piece of cereal. Four basic behaviors were monitored for 10 min using J Watcher software: exploration of the surface bedding or the walls and upper part of the cage, digging into the bedding, grooming, staying immobile.

### 2.4.2. Odor-induced sniffing behavior

A whole-body plethysmograph chamber (Emka Technologies, France) was used to record mice respiratory activity during odor stimulations in an experimental setup adapted from Hegoburu *et al.* (Hegoburu et al., 2011) (**Figure 3A**). Mice breathing induced pressure changes measured by a differential pressure sensor with one port exposed to the animal chamber and the other to the above reference chamber. Constant airflow (2.2 L/min) was provided through the apparatus, and a lateral port was connected to a vial containing the odorant solution. The vial was connected by a plastic tube equipped with a 3-way valve, allowing airflow deviation to deliver odorized air within the animal chamber.

The respiratory signal collected from the plethysmograph was interfaced to a computer equipped with AxoScope (Axon Instruments; sampling rate = 1 kHz). The recordings were analyzed with routines written under Matlab. Inspiration and expiration phases were extracted to calculate respiratory frequency (mean number of respiratory cycles per second) and inspiration amplitude (mean size of inspiration phases). In subsequent analysis, a z-normalization was applied (Guilloux et al., 2011) to integrate these parameters as a sniffing index (called "z-sniffing"). For each mouse and each parameter, a z-score was calculated as follows:  $z = ((x-\mu)/\sigma)$  where  $x$  represents the individual data for the calculated parameter, and  $\mu$  and  $\sigma$  the mean and standard deviation for the CTRL group during base period, respectively. Then the mean of the two z-score (z-amplitude and z-frequency) was calculated and taken as the sniffing index for each animal. The day before the actual test, mice were placed inside the plethysmograph and stimulations with distilled water inside the vial were

performed to habituate mice to airflow deviations. On test day, male pups were separated from their mother for 1h and introduced in the plethysmograph. They were allowed to calm down during 5 minutes before starting the stimulations. Each stimulation lasted 30 seconds, was preceded by a 30 seconds baseline period and followed by another 30 seconds period to allow mice to return to a quiet state. For the baseline period, the experimenter waited for the mouse not to be actively sniffing, in order to avoid bias in the basal breathing due to exploratory sniffing events. The first 3-6 stimulations were performed with distilled water inside the vial, until the mouse did not respond to the stimulation. Then, two consecutive odorant stimulations were performed with PEA (Sigma Aldrich) solutions inside the vial, first at  $10^{-5}$  M then at  $10^{-4}$  M.

From the breathing recordings, two exclusion criteria were established: the animal was excluded from the analysis if 1) the basal respiratory frequency was higher than 7.5Hz during 2 or more stimulations, indicating a failure to reduce stress, 2) the last stimulation with water induced a 10% increase (or more) in respiratory frequency and inspiration amplitude during stimulation time compared to the basal period, indicating a failure in habituation to airflow deviation.

## 2.5. EOG recordings

EOG recordings were performed on turbinates III from an opened nasal cavity on mouse hemi-heads as previously described (Lacroix et al., 2008). Briefly, the hemi-head was placed under a constant flow of humidified air (~1L/min) delivered through a 7 mm-diameter plastic tube, positioned 2 cm from the epithelial surface. Odorant stimulations were performed by blowing air puffs (200 ms, 1 psi) through an exchangeable Pasteur pipette, enclosed in the plastic tube, containing a filter paper impregnated with 10  $\mu$ L of odorant solution. PEA and acetophenone (ACE; Sigma Aldrich) were used as odorants. Odorant-free air stimulation (with ultra-pure water) was always performed before any odorant stimulation to record mechanical responses. EOG voltage signals were recorded using a Axoclamp amplifier (Axon Instruments) used in a DC current-clamp configuration ( $I=0$ ), digitized at a rate of 1 kHz, using a Digidata 1440 (Axon Instruments, Molecular Devices) and interfaced to a computer equipped with AxoScope. A reference Ag/AgCl electrode was placed in the OB. Recordings were made with glass micropipettes (8  $\mu$ m-diameter) filled with a saline solution (Lacroix et al., 2008). Data was analyzed using Matlab to measure peak amplitude and dose-response curves were fitted with the Hill equation model ( $A = A_{max}/(1+10^{-k(C-EC50)})$ , where A represents the peak amplitude,  $A_{max}$  the maximum response at saturating concentrations, k the Hill coefficient, C the concentration of odorant and EC50 the concentration at which half of the maximum response was reached).

## 2.6. Quantitative RT-Polymerase Chain Reaction (qPCR)

Mice were dazed with isoflurane inhalation, sacrificed by decapitation and the nose was dissected out to remove the olfactory epithelium attached to the nasal septum and the dorsal recess. The olfactory tissue was immediately frozen into liquid nitrogen and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  until RNA extraction. Total RNA was extracted (Nucleospin RNA plus kit, Macherey-Nagel) and cDNA were synthesized from 1  $\mu$ g of RNA using reverse transcriptase (PrimeScript<sup>TM</sup> RT reagent Kit, Takara) following the manufacturer recommendations. For quantitative PCR, 1  $\mu$ L (50 ng) of cDNA templates were added to the 9  $\mu$ L reaction mixture containing SYBR Green Master Mix (Life technologies) and 250 nM primers (see **Supplementary Table 2** for primers sequences). The qPCR was performed on a StepOne thermocycler (ThermoFisher Scientific, Applied Biosystems) during 40 amplification cycles consisting of 3 s at  $95^{\circ}\text{C}$  and 30 s at  $60^{\circ}\text{C}$ . Quantification was achieved by calculation the Ct difference between the gene of interest and the reference gene (*Gapdh*) for each mouse.

## 2.7. Statistical analysis

All statistical analyses were done using GraphPad Prism software and blind to the experimenter. Data are expressed as mean  $\pm$  standard error of the mean (SEM), except for sniffing indexes which were represented as box and whiskers. Normality was systematically

tested using Shapiro test to determine parametric or non-parametric statistical plan. One-way ANOVA followed by Tuckey post hoc tests or Kruskal Wallis followed by Dunn's multiple comparison test were used to determine statistical differences between the three groups; except for male body weight evolution during lactation, glucose tolerance test, and sniffing indexes which were analyzed using two-way repeated measures ANOVA followed by Bonferroni multiple comparisons. A probability value of  $p < 0.05$  was used as an indication of statistical differences.

### 3. RESULTS

#### 3.1. Maternal HFHS diet does not compromise lactation but changes milk composition

Before mating, the global weight gain from diet onset was 41% lower in females fed with the HFHS diet compared to females fed with the CTRL diet (**Supplementary figure 2.A.2**, (t,df) = (3.449,35),  $p = 0.0015$ ). However, HFHS diet for two months induced glucose intolerance in dams (**Supplementary figure 2.B.2**,  $F(1,21) = 13.25$ ,  $p = 0.0015$ ). During gestation and lactation, dams body weight evolution differed between the three groups (**Supplementary figure 3.A**,  $F(2,49) = 3.462$ ,  $p = 0.0392$ ) and dams fed with the HFHS diet ingested more energy particularly during mid-lactation (**Supplementary figure 3.B**,  $F(2,43) = 8.548$ ,  $p = 0.0007$ ).

After birth, the number of pups per litter was standardized to avoid any litter size effect and to ensure equivalent milk access for each pup. The milk access was verified: milk intake and consequently milk production were similar at mid-lactation (L10) in the three groups (**Table 1**,  $F(2,27) = 1.77$ ,  $p = 0.190$ ).

Milk composition at L10 from CTRL and HFHS groups is depicted in **Table 1**. There were no significant differences in protein or lactose content between groups ( $K = 0.987$ ,  $p = 0.611$  for protein content and  $K = 0.007$ ,  $p = 0.997$  for lactose content). The total milk fat content did not differ between CTRL and HFHS dams ( $K = 4.987$ ,  $p = 0.0826$ ), however the fat composition changed in the milk of HFHS dams. Milk from HFHS diet fed dams contained 1) less saturated fatty acids (SFA), especially less lauric, myristic and palmitic acids (C12:0, C14:0 and C16:0), 2) much more oleic acid (C18:1 n-9), which is a monounsaturated fatty acid (MUFA), 3) less polyunsaturated fatty acids (PUFA) and a higher n-6 / n-3 ratio, caused by less linoleic acid (C18:2 n-6) and less linolenic and docosahexaenoic acids (C18:3 n-3 and C22:6 n-3) (**Supplementary table 3**).

#### 3.2. Impact of the mother's diet on the progeny metabolic phenotype

To evaluate the impact of maternal HFHS diet on general metabolic features in the offspring, we first analyzed the growth pattern of pups. As shown in **Figure 1**, pups from HFHS diet fed dams exhibited similar birth weight compared to CTRL group (**Figure 1.A**,  $K = 2.285$ ,  $p = 0.319$ ). They became significantly overweight during lactation (**Figure 1.B**,  $F(2,175) = 16.81$ ,  $p < 0.001$ ): by 10.3 % (HFHS gest-lact,  $p < 0.01$  compared to CTRL) and 11.5 % (HFHS 8w + gest-lact,  $p < 0.05$  compared to CTRL) at PND 15, and by 13.1 % (HFHS gest-lact,  $p < 0.001$  compared to CTRL) and 11.1 % (HFHS 8w + gest-lact,  $p < 0.001$  compared to CTRL) at weaning. Furthermore, at weaning, the offspring of HFHS diet fed dams presented higher amounts of visceral fat (x2.2 for HFHS gest-lact and x2.8 for HFHS 8w + gest-lact compared to CTRL group, **Figure 1.C**,  $K = 25.08$ ,  $p < 0.001$ ). When we investigated the plasma levels of metabolic hormones, we found increased levels of leptin in HFHS pups (x1.8 for HFHS gest-lact and x2.0 for HFHS 8w + gest-lact compared to CTRL group, **Figure 1.D**,  $K = 11.36$ ,  $p < 0.01$ ), which is in accordance with increased fat mass in these pups. Regarding glucose metabolism, there was a difference neither in basal glycaemia (**Figure 1.E**,  $F(2,36) = 2.31$ ,  $p = 0.114$ ), nor in glucose tolerance (**Figure 1.F**,  $F(2,36) = 0.711$ ,  $p = 0.498$ ) between the three groups.

To summarize, in our experimental design, maternal HFHS diet led to the onset of metabolic disturbances in the offspring.

### 3.3. The offspring from HFHS diet fed dams exhibit reduced olfactory abilities

General olfactory abilities were first assessed in a buried food test (**Figure 2**). In this food-finding context, the progeny of HFHS diet fed dams exhibited increased time ( $\times 1.9$ ) to retrieve the buried cereal (**Figure 2.B**,  $K = 12.92$ ,  $p = 0.0016$ ).

Several non-olfactory factors could explain this behavioral result. In the first trial, when the cereal was visible, all mice displayed similar time ( $\sim 10$  sec) to navigate into the cage, find and eat the food item (**Figure 2.A**,  $K = 3.855$ ,  $p = 0.146$ ). Thus, HFHS progeny were as motivated to find food as CTRL mice. Moreover, retrieving the buried food implies not only to explore the surface bedding, but also to dig deep into the bedding. We performed a spontaneous behavioral observation without hidden cereal to characterize the digging behavior of CTRL and HFHS progenies. Within 10 min, the spontaneous behavioral pattern was similar between the three groups (**Figure 2.C**). More precisely, mice spent around 20 % of total time digging (CTRL: 22.22 %, HFHS gest-lact: 19.95 %, HFHS 8w + gest-lact: 18.83 %,  $F(2,46) = 0.341$ ,  $p = 0.713$ ) and more than 70 % of total time walking or running on the surface bedding (CTRL: 73.12 %, HFHS gest-lact: 71.94 %, HFHS 8w + gest-lact: 72.92 %,  $F(2,46) = 0.0371$ ,  $p = 0.964$ ).

To sum up, maternal HFHS diet did not impact motivation to find food or digging behavior in the offspring, but reduced their olfactory ability towards a food odor.

In order to investigate olfactory perception in freely behaving mice, independently of feeding context or rewarded behavior, we used a whole-body plethysmograph to record mice breathing (**Figure 3.A**) and assess odorant perception. For each stimulation, we checked that mice basal breathing was similar between the three groups (non-patterned boxes, diet effect:  $F(2,72) = 2.194$ ,  $p = 0.119$ ,  $F(2,72) = 0.00992$ ,  $p = 0.990$ ,  $F(2,72) = 2.193$ ,  $p = 0.119$  for stimulation with water, PEA  $10^{-5}$  M, PEA  $10^{-4}$  M respectively).

During the first non-odorized stimulation, mice did not modify their sniffing behavior (**Figure 3.B**, time effect:  $F(1,72) = 0.0322$ ,  $p = 0.858$ ). When PEA was presented at  $10^{-5}$  M, only CTRL mice increased their sniffing behavior (**Figure 3.C**, time effect:  $F(1,72) = 16.69$ ,  $p < 0.001$ ), whereas the three groups exhibited increased sniffing behavior when PEA was presented at  $10^{-4}$  M (**Figure 3.D**, time effect:  $F(1,72) = 62.58$ ,  $p < 0.001$ ). Contrary to CTRL group, HFHS progenies did not react to the lower odorant concentration, which highlights altered odor-induced behavior.

All together, these results showed that maternal HFHS diet impaired olfactory perception in the offspring. Is this impairment correlated with a modulation of odorant detection at the peripheral olfactory level?

### 3.4. Altered olfactory perception in the progeny is not associated with changes in the sensitivity of the OM

To investigate whether odor detection by the OM was altered in HFHS progenies, we recorded the electrical response of a population of OSNs following odorant stimulations with EOG measurements. Using PEA to perform odorant stimulations, dose-response curves for peak amplitudes largely overlapped between the three groups (**Figure 4.A.1**). Maternal HFHS diet did not modify the dose-response characteristics of OSNs (**Figure 4.A.2**,  $K = 4.505$ ,  $p = 0.105$ ,  $K = 0.905$ ,  $p = 0.636$ ,  $F(2,41) = 1.148$ ,  $p = 0.327$  for  $-\log(\text{EC}_{50})$ , Hill coefficient and  $A_{\text{max}}$  respectively). When odorant stimulations were performed with acetophenone, Hill coefficient and  $-\log(\text{EC}_{50})$  were not affected by maternal HFHS diet (**Figure 4.B.2**,  $F(2,34) = 2.029$ ,  $p = 0.147$ ,  $F(2,34) = 1.941$ ,  $p = 0.159$  for  $-\log(\text{EC}_{50})$  and Hill coefficient respectively), but the average maximum amplitude elicited by saturating concentrations was slightly increased in mice from dams under HFHS diet during 8 weeks, gestation and lactation (**Figure 4.B.2**,  $K = 6.457$ ,  $p = 0.0396$ ).

To confirm that OM functioning was not disrupted in HFHS progenies, we analyzed gene expression of four main constituents of olfactory transduction cascade. No difference was found in gene expression of Golf (**Figure 5.A.1**,  $K = 2.415$ ,  $p = 0.299$ ), ACIII (**Figure 5.A.2**,  $K$

= 0.613,  $p = 0.736$ ), CNG (**Figure 5.A.3**,  $K = 0.571$ ,  $p = 0.752$ ) and PDE (**Figure 5.A.4**,  $K = 1.318$ ,  $p = 0.517$ ).

OM cells (OSNs and supporting cells) also express numerous receptors for metabolic hormones, such as insulin and leptin, that enables a metabolic influence on olfactory perception (Palouzier-Paulignan et al., 2012). In our three groups of mice, gene expression of insulin receptor (Ins-R) was similar (**Figure 5.B.1**,  $K = 1.112$ ,  $p = 0.573$ ), but leptin receptor (Lept-R) was 8.1 % less expressed in HFHS 8w + gest-lact group compared to CTRL group (**Figure 5.B.2**,  $K = 9.825$ ,  $p = 0.0074$ ).

#### 4. DISCUSSION

Recent literature has reported deleterious effects of maternal obesity and diet on progeny's health but no insights were provided into the impact on sensory systems in the offspring. In this study we report that maternal HFHS diet disrupts olfactory behavior in the 3-week old progeny. Male mice born from dams fed with the HFHS diet were overweight at weaning stage compared to CTRL mice, and exhibited higher visceral adiposity associated with increased plasma leptin levels. The altered olfactory abilities were not found to be correlated with alterations of the peripheral olfactory system.

In our experimental design, female mice showed a resistance to diet-induced obesity, a phenomenon which has already been reported (Wahlig et al., 2012). Dams fed with the HFHS diet for two months did not gain weight despite the obesogenic context, but developed glucose intolerance. The effects of maternal HFHS diet feeding on the olfactory system of the progeny were independent of maternal obesity. We can further notice that maternal HFHS exposure during the pre-conception period did not exacerbate the effects of HFHS exposure during gestation and lactation. Indeed, for every parameter measured in the offspring (metabolic or olfactory parameter), the values for HFHS gest-lact group and HFHS 8w + gest-lact group were not statistically different. In our protocol, the metabolic state of females prior to mating (i.e. glucose intolerance) did not induce any additional olfactory defects in progeny. This suggests that the critical period for maternal diet to impact olfaction in the offspring might be found during gestation and/or lactation. Additional groups with diet switching after parturition could be used to investigate in which precise period maternal HFHS diet most influences progeny's olfactory abilities.

Milk from HFHS diet fed dams contained similar amounts of protein, lactose and lipid, but the fatty acids (FA) composition was different. Exposure to a moderate high-fat (HF) diet without obesity has been shown to increase the trafficking of dietary lipids to adipose tissue, liver and mammary gland while subsequently decreasing de novo lipogenesis in these tissues, leading to changes in milk FA composition without affecting the global fat content (Wahlig et al., 2012). In line with previous studies, we highlighted a decrease in SFA content in the milk of HFHS diet fed dams. MUFA and PUFA contents did not vary as expected from other studies which could be explained by the specificities of the diet used in the present study. Milk PUFA composition was shown to be specifically manipulated by the maternal diet composition; meanwhile, milk MUFA content appeared very resistant to manipulation of the dietary FA composition (Oosting et al., 2015). Our data showed that the MUFA and PUFA milk levels reflected the respective quantities from maternal diet. MUFA were almost twice more concentrated in the milk of dams exposed to the HFHS diet than the milk of CTRL dams, as is the HFHS diet compared to the SD. Taken together, our results clearly confirmed that the pups' dietary FA intake was modulated by maternal exposure to the HFHS diet. FA are mandatory constituents of neuronal membranes, and the FA composition of the milk consumed by HFHS offspring could have prevented the normal development of neurons involved in olfactory processing.

Our experimental design provides a perinatal exposure to fat and sugar through maternal diet with few consistent effects on offspring metabolic physiology, as already reported by others (Chin et al., 2017). In addition to similar fat, protein and lactose total amounts among maternal milks, we found no difference of milk consumption between the three groups. The weight gain observed in HFHS progenies' from PND 15 to PND 20 could thus result from

early independent feeding rather than higher energy intake from milk. Such a phenomenon has been observed in rats: maternal HF diet increased pre-weanling offspring body weight by facilitating early independent feeding, through a nutritive nursing and without affecting suckling parameters (Kojima et al., 2016).

The progeny of dams fed with the HFHS diet exhibited higher amounts of visceral fat and enhanced circulating leptin. We can assume that pups born from HFHS diet fed dams are at very early stages of developing metabolic disturbances. Few studies have investigated the effects of diet on olfactory abilities. Older mice affected by metabolic syndrome or diabetes after direct adult exposure to modified diets also display increased time to retrieve a food item during a buried food test (Rivière et al., 2016; Tucker et al., 2012). In addition to showing decreased olfactory abilities in the buried food test, we demonstrated lower PEA perception, a non-food but attractive odor (Root et al., 2014), using the plethysmograph device. Unlike the studies of Thiebaut and Rivière, our data indicates that impaired olfactory abilities are not correlated with modifications of the OM. We only observed using EOG recordings that the maximum of the dose-response curve after ACE stimulations was higher in HFHS 8w + gest-lact group compared to CTRL group. We assume that this difference might not be relevant regarding OM sensitivity, which would be more correlated to EC50 and dynamic range of the responses (Hill coefficient). The discrepancy with previous studies may underlie the complex relationships between metabolic and olfactory systems. The way individuals are exposed to fat and sugar, i.e. direct exposure through adult diet or perinatal exposure through maternal diet, must differently influence olfactory structures.

Olfactory perception does not only rely on odorant detection by the peripheral olfactory system, but also on central integration of the olfactory message. The OB receives inputs from OSNs and sends neuronal projections to the olfactory cortex, which then innervates numerous brain areas (hypothalamus, amygdala, and hippocampus). Although we did not explore all the anatomical and physiological characteristics of the olfactory mucosa, our results suggest that altered olfactory behavior in HFHS progeny would rather derive from modifications in the central nervous system.

Maternal diet has been shown to alter brain anatomy and physiology in the offspring: HF maternal intakes, prior and during gestation, may alter fetal brain development. Cell proliferation, apoptosis and early neuronal differentiation in fetal hippocampus were affected by HF diet-induced maternal obesity in mice (Niculescu and Lupu, 2009). Maternal obesity also increased the proliferation of neuronal precursor cells (Chang et al., 2008) and astrocytes (Dong et al., 2016) in fetal and neonatal hypothalamus. The development of the olfactory system starts as early as embryonic day 10 (E10) (Smart, 1971). In the OB, mitral and tufted cells are entirely produced before birth and OB granule cells arise from E18 to PND 20 (Hinds, 1968). In the central olfactory system (piriform cortex, olfactory tubercle, anterior olfactory nucleus, lateral olfactory tract), fiber growth begins prenatally but maturation and connections mainly occur after birth (Schwob and Price, 1984). Therefore, the olfactory system undergoes pronounced cell proliferation and maturation early during embryonic development and during postnatal life. Processes observed in the hippocampus and hypothalamus after maternal HF diet could also affect the developmental steps and the plasticity of the olfactory system.

In addition, maternal HF diet might alter astrocytic and neuronal morphology. In adult rats, astrocyte morphology in the hippocampus was modified following perinatal exposure to a HF diet without maternal obesity (Lépinay et al., 2015). Adult offspring from HF diet fed dams further exhibited shorter basal dendrites in hippocampal and basolateral pyramidal neurons (Janthakhin et al., 2017), and a loss of spines in the somatosensory cortex (Hatanaka et al., 2016), leading to synaptic instability and subsequent impaired neuronal processing. Maternal HF diet also decreased both spine density and dendritic length in medial prefrontal cortex of 3 week-old pups (Rincel et al., 2017). Altered olfactory abilities observed in our model could partly derive from such neuro-morphological modifications affecting olfactory neurons in the OB or in the other brain structures integrating olfactory information.

Leptin has proven to be very efficient as a modulator of the olfactory system. Genetically engineered mice lacking leptin physiological regulation (*ob/ob* and *db/db* mice) exhibit improved olfactory abilities compared to wild-type ones (Getchell et al., 2006), and injecting leptin in starved rats decreases olfactory detection ability (Julliard et al., 2007). Besides, leptin has been shown to directly modulate the electrical activity of OSNs (Savigner et al., 2009). Leptin levels were twice higher in the progeny of dams fed with HFHS diet compared to CTRL mice, which is in line with previous findings (Janthakhin et al., 2017; Lépinay et al., 2015). Consequently, the high leptin titers measured in the HFHS group could have contributed to the decreased olfactory perception observed in these animals.

Lept-R was less expressed in HFHS 8w + gest-lact group compared to CTRL group. Because plasma leptin levels were higher in this group, we assume that lower expression of Lept-R in MOE reflects a compensatory mechanism that could have prevented a modulatory effect of leptin at the peripheral level of the olfactory system.

It is well known that leptin has been involved in neurodevelopment. The effects of leptin in the brain are not limited to the neural control of feeding behavior in mature animals: leptin can also influence neurodevelopmental processes in the immature brain. Leptin acts as a neurotrophic agent that promotes neurogenesis, axon growth, synaptic plasticity and dendritic morphology (Bouret, 2010). Leptin receptors are expressed in the brain as early as E10.5 (Hoggard et al., 1997; Udagawa et al., 2000), and are found in the adult olfactory system (Baly et al., 2007; Getchell et al., 2006; Shioda et al., 1998). During the leptin surge identified between PND 7 and 10 (Ahima et al., 1998), maternal HFHS diet exposure may have contributed to more elevated leptin levels leading to impairment of olfactory circuitry formation.

Other numerous peptides and hormones are involved in modulating olfaction (Palouzier-Paulignan et al., 2012). These metabolic factors could have participated in the modulation of olfactory abilities in the progeny of HFHS diet fed dams. Insulin is known to exert effects on OSNs and olfactory perception similar to the action of leptin. In our design, the glycaemia of pups from dams fed with the HFHS diet was not different from the glycaemia of CTRL pups, and they presented normal glucose tolerance. Therefore, insulin levels and regulation might not be impaired in these pups, making insulin unlikely to alter their olfactory behavior. However, orexins, ghrelin, glucagon, were not quantified in this study. Further work is needed to better characterize the effects of these other metabolic peptides in pups born to mice fed with a HFHS diet.

To our knowledge, we provide for the first time evidence for a deleterious impact of maternal HFHS diet on progeny's olfactory abilities. Impaired olfaction in the 3-week old progeny was not correlated to modifications of olfactory mucosa functioning. We infer that central processing of olfactory information might be affected by the perinatal exposure to HFHS diet. Because leptin is involved in both modulating the activity of olfactory neurons and brain developmental processes, leptin is a strong candidate to constitute the link between maternal HFHS diet and altered olfactory perception in progeny. When (i.e. during embryonic development or at postnatal stages), where (i.e. in the OB, piriform cortex) and how (i.e. by regulating proliferation, dendritic morphology) leptin could potentially act remain to be determined.

## **ACKNOWLEDGEMENTS**

Authors would like to thank Anne Lefranc, Martin Bertomeu, Patrick Cailler and the CSGA animal facility for excellent animal care. Funding was provided to DJ from the Institut National de la Recherche Agronomique (INRA). LM received a PhD fellowship from the French Ministry of Research and Higher Education.

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

LM, DJ and XG designed the research. LM, OP, PB, SG, VS and DJ performed experiments. LM and DJ analyzed data and performed statistical analyses. LM, DJ and XG wrote this paper. Graphical abstract and figure 3 were made using images from Servier Medical Art, licensed under a Creative Commons Attribution 3.0 Unported License (CC-BY) and available at <https://smart.servier.com/>.

## CONFLICT OF INTEREST

The authors report no conflict of interest.

## REFERENCES

- Ahima, R.S., Prabakaran, D., Flier, J.S., 1998. Postnatal leptin surge and regulation of circadian rhythm of leptin by feeding. Implications for energy homeostasis and neuroendocrine function. *J. Clin. Invest.* 101, 1020–1027. <https://doi.org/10.1172/JCI1176>
- Aimé, P., Hegoburu, C., Jaillard, T., Degletagne, C., Garcia, S., Messaoudi, B., Thevenet, M., Lorsignol, A., Duchamp, C., Mouly, A.M., 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, 1–13. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0051227>
- Andersen, R.E., 2000. The spread of the childhood obesity epidemic. *Can. Med. Assoc. J.* 163, 1461–1462.
- Baly, C., Aioun, J., Badonnel, K., Lacroix, M.C., Durieux, D., Schlegel, C., Salesse, R., Caillol, M., 2007. Leptin and its receptors are present in the rat olfactory mucosa and modulated by the nutritional status. *Brain Res.* 1129, 130–141. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2006.10.030>
- Barker, D., 1990. The fetal and infant origins of adult disease. *BMJ Br. Med. J.* 301, 1111. <https://doi.org/10.1136/bmj.301.6761.1111>
- Barnes, S.K., Ozanne, S.E., 2011. Pathways linking the early environment to long-term health and lifespan. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 106, 323–336. <https://doi.org/10.1016/j.pbiomolbio.2010.12.005>
- Bouret, S.G., 2010. Neurodevelopmental actions of leptin. *Brain Res.* 1350, 2–9. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2010.04.011>
- Bowe, J.E., Franklin, Z.J., Hauge-Evans, A.C., King, A.J., Persaud, S.J., Jones, P.M., 2014. Assessing glucose homeostasis in rodent models. *J. Endocrinol.* 222, 13–25. <https://doi.org/10.1530/JOE-14-0182>
- Chang, G.-Q., Gaysinskaya, V., Karatayev, O., Leibowitz, S.F., 2008. Maternal high-fat diet and fetal programming: increased proliferation of hypothalamic peptide-producing neurons that increase risk for overeating and obesity. *J. Neurosci.* 28, 12107–12119. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2642-08.2008>
- Chin, E.H., Schmidt, K.L., Martel, K.M., Wong, C.K., Hamden, E., Gibson, W.T., Soma, K.K., Christians, J.K., 2017. A maternal high-fat high-sucrose diet has sex-specific effects on fetal glucocorticoids with little consequence for offspring metabolism and voluntary locomotor activity in mice. *PLoS One* 12, 1–20. <https://doi.org/https://doi.org/10.1371/journal.pone.0174030>
- Depeters, E.J., Hovey, R.C., 2009. Methods for collecting milk from mice. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* 14, 397–400. <https://doi.org/10.1007/s10911-009-9158-0>
- Dong, A., Kim, W., Glendinning, K.A., Jasoni, G.C.L., 2016. Maternal obesity leads to increased proliferation and numbers of astrocytes in the developing fetal and neonatal mouse hypothalamus. *Int. J. Dev. Neurosci.* <https://doi.org/10.1016/j.ijdevneu.2016.06.005>
- Dong, M., Zheng, Q., Ford, S.P., Nathanielsz, P.W., Ren, J., 2013. Maternal obesity, lipotoxicity and cardiovascular diseases in offspring. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 55, 111–116. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2012.08.023>
- Getchell, T. V., Kwong, K., Saunders, C.P., Stromberg, A.J., Getchell, M.L., 2006. Leptin

- regulates olfactory-mediated behavior in ob/ob mice. *Physiol. Behav.* 87, 848–856. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2005.11.016>
- Grosmaître, X., Fuss, S.H., Lee, A.C., Adipietro, K. a, Matsunami, H., Mombaerts, P., Ma, M., 2009. SR1, a mouse odorant receptor with an unusually broad response profile. *J. Neurosci.* 29, 14545–14552. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2752-09.2009>
- Guilloux, J., Seney, M., Edgar, N., Sibille, E., 2011. Integrated behavioral z -scoring increases the sensitivity and reliability of behavioral phenotyping in mice: Relevance to emotionality and sex. *J. Neurosci. Methods* 197, 21–31. <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2011.01.019>
- Hatanaka, Y., Wada, K., Kabuta, T., 2016. Maternal high-fat diet leads to persistent synaptic instability in mouse offspring via oxidative stress during lactation. *Neurochem. Int.* 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2016.03.008>
- Hegoburu, C., Shionoya, K., Garcia, S., Messaoudi, B., Thévenet, M., Mouly, A.-M., 2011. The RUB cage: respiration-ultrasonic vocalizations-behavior acquisition setup for assessing emotional memory in rats. *Front. Behav. Neurosci.* 5, 1–13. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2011.00025>
- Hinds, J.W., 1968. Autoradiographic study of histogenesis in the mouse olfactory bulb I. Time of origin of neurons and neuroglia. *J. Comp. Neurol.* 134, 287–304. <https://doi.org/10.1002/cne.901340304>
- Hoggard, N., Hunter, L., Duncan, J.S., Williams, L.M., Trayhurn, P., Mercer, J.G., 1997. Leptin and leptin receptor mRNA and protein expression in the murine fetus and placenta. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94, 11073–8. <https://doi.org/10.1073/PNAS.94.20.11073>
- Janthakhin, Y., Rincel, M., Costa, A.M., Darnaudéry, M., Ferreira, G., 2017. Maternal high-fat diet leads to hippocampal and amygdala dendritic remodeling in adult male offspring. *Psychoneuroendocrinology* 83, 49–57. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2017.05.003>
- Julliard, A.K., Chaput, M.A., Apfelbaum, A., Aimé, P., Mahfouz, M., Duchamp-Viret, P., 2007. Changes in rat olfactory detection performance induced by orexin and leptin mimicking fasting and satiation. *Behav. Brain Res.* 183, 123–129. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2007.05.033>
- Kojima, S., Catavero, C., Rinaman, L., 2016. Maternal high-fat diet increases independent feeding in pre-weanling rat pups. *Physiol. Behav.* 157, 237–245. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2016.02.010>
- Lacroix, M.C., Badonnel, K., Meunier, N., Tan, F., Poupon, C.S. Le, Durieux, D., Monnerie, R., Baly, C., Congar, P., Salesse, R., Caillol, M., 2008. Expression of insulin system in the olfactory epithelium: First approaches to its role and regulation. *J. Neuroendocrinol.* 20, 1176–1190. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2826.2008.01777.x>
- Lépinay, A.L., Larrieu, T., Joffre, C., Acar, N., Gárate, I., Castanon, N., Ferreira, G., Langelier, B., Guesnet, P., Brétilon, L., Parnet, P., Layé, S., Darnaudéry, M., 2015. Perinatal high-fat diet increases hippocampal vulnerability to the adverse effects of subsequent high-fat feeding. *Psychoneuroendocrinology* 53, 82–93. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2014.12.008>
- Lu, G.C., Rouse, D.J., DuBard, M., Cliver, S., Kimberlin, D., Hauth, J.C., 2001. The effect of the increasing prevalence of maternal obesity on perinatal morbidity. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 185, 845–849. <https://doi.org/10.1067/mob.2001.117351>
- Negrini, 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, 1–10. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0045266>
- Niculescu, M.D., Lupu, D.S., 2009. High fat diet-induced maternal obesity alters fetal hippocampal development. *Int. J. Dev. Neurosci.* 27, 627–633. <https://doi.org/10.1016/j.ijdevneu.2009.08.005>
- Oosting, A., Verkade, H.J., Kegler, D., Van De Heijning, B.J.M., Van Der Beek, E.M., 2015. Rapid and selective manipulation of milk fatty acid composition in mice through the maternal diet during lactation. *J. Nutr. Sci.* 4, 1–10. <https://doi.org/10.1017/jns.2015.13>
- Palouzier-Paulignan, B., Lacroix, M.-C., Aime, P., Baly, C., Caillol, M., Congar, P., Julliard,

- A.K., Tucker, K., Fadool, D.A., 2012. Olfaction Under Metabolic Influences. *Chem. Senses* 37, 769–797. <https://doi.org/10.1093/chemse/bjs059>
- 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, 1287–1298. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2009.05.043>
- Ribaroff, G.A., Wastnedge, E., Drake, A.J., Sharpe, R.M., Chambers, T.J.G., 2017. Animal models of maternal high fat diet exposure and effects on metabolism in offspring: a meta-regression analysis. *Obes. Rev.* 18, 673–686. <https://doi.org/10.1111/obr.12524>
- Rincel, M., Lépinay, A.L., Janthakhin, Y., Soudain, G., Yvon, S., Da Silva, S., Joffre, C., Aubert, A., Séré, A., Layé, S., Theodorou, V., Ferreira, G., Darnaudéry, M., 2017. Maternal high-fat diet and early life stress differentially modulate spine density and dendritic morphology in the medial prefrontal cortex of juvenile and adult rats. *Brain Struct. Funct.* <https://doi.org/10.1007/s00429-017-1526-8>
- Rivière, S., Soubeyre, V., Jarriault, D., Molinas, A., Léger-Charnay, E., Desmoulin, L., Grebert, D., Meunier, N., Grosmaître, X., 2016. High Fructose Diet inducing diabetes rapidly impacts olfactory epithelium and behavior in mice. *Sci. Rep.* 6, 1–13. <https://doi.org/10.1038/srep34011>
- Root, C.M., Denny, C.A., Hen, R., Axel, R., 2014. The participation of cortical amygdala in innate, odour-driven behaviour. *Nature* 515, 269–273. <https://doi.org/10.1038/nature13897>
- Savigner, A., Duchamp-Viret, P., Grosmaître, X., Chaput, M., Garcia, S., Ma, M., Palouzier-Paulignan, B., 2009. Modulation of spontaneous and odorant-evoked activity of rat olfactory sensory neurons by two anorectic peptides, insulin and leptin. *J. Neurophysiol.* 101, 2898–2906. <https://doi.org/10.1152/jn.91169.2008>
- Schwob, J.E., Price, J.L., 1984. The development of axonal connections in the central olfactory system of rats. *J. Comp. Neurol.* 223, 177–202. <https://doi.org/10.1002/cne.902230204>
- Shioda, S., Funahashi, H., Nakajo, S., Yada, T., Maruta, O., Nakai, Y., 1998. Immunohistochemical localization of leptin receptor in the rat brain. *Neurosci. Lett.* 243, 41–44. [https://doi.org/10.1016/S0304-3940\(98\)00082-2](https://doi.org/10.1016/S0304-3940(98)00082-2)
- Smart, I.H., 1971. Location and orientation of mitotic figures in the developing mouse olfactory epithelium. *J. Anat.* 109, 243–51.
- Sullivan, E.L., Riper, K.M., Lockard, R., Valteau, J.C., 2015. Maternal high-fat diet programming of the neuroendocrine system and behavior. *Horm. Behav.* 76, 153–161. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2015.04.008>
- Sumner, J.B., Noback, C. V., 1924. The estimation of sugar in diabetic urine, using dinitrosalicylic acid. *J. Biol. Chem.* 62, 287–290.
- 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., Fadool, D.A., 2014. Hyperlipidemic diet causes loss of olfactory sensory neurons, reduces olfactory discrimination, and disrupts odor-reversal learning. *J. Neurosci.* 34, 6970–84. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3366-13.2014>
- Thierry, M., Pasquis, B., Acar, N., Grégoire, S., Febvret, V., Buteau, B.N., Gambert-Nicot, S., Bron, A.M., Creuzot-Garcher, C.P., Bretilon, L., 2014. Metabolic syndrome triggered by high-fructose diet favors choroidal neovascularization and impairs retinal light sensitivity in the rat. *PLoS One* 9, 1–13. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0112450>
- Tong, J., Mannea, E., Aimé, P., Pfluger, P.T., Yi, C., Castaneda, T.R., Davis, H.W., Ren, X., Pixley, S., Benoit, S., Julliard, K., Woods, S.C., Horvath, T.L., Sleeman, M.M., D'Alessio, D., Obici, S., Frank, R., Tschöp, M.H., 2011. Ghrelin enhances olfactory sensitivity and exploratory sniffing in rodents and humans. *J. Neurosci.* 31, 5841–6. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5680-10.2011>
- Tucker, K.R., Godbey, S.J., Thiebaud, N., Ann, D., 2012. Olfactory ability and object memory in three mouse models of varying body weight, metabolic hormones, and adiposity. *Physiol. Behav.* 107, 424–432. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2012.09.007>
- Udagawa, J., Hatta, T., Otani, H., Naora, H., 2000. Expression of the long form of leptin

- receptor (Ob-Rb) mRNA in the brain of mouse embryos and newborn mice. *Brain Res.* 868, 251–258. [https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(00\)02334-9](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(00)02334-9)
- Wahlig, J.L., Bales, E.S., Jackman, M.R., Johnson, G.C., McManaman, J.L., MacLean, P.S., 2012. Impact of high-fat diet and obesity on energy balance and fuel utilization during the metabolic challenge of lactation. *Obesity* 20, 65–75. <https://doi.org/10.1038/oby.2011.196>
- Williams, L., Yoshinori, S., Vuguin, P.M., Charron, M.J., 2014. Animal models of in utero exposure to a high fat diet: a review. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids* 1842, 507–519. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2013.07.006>.Animal
- Yang, M., Crawley, J.N., 2009. Simple behavioral assessment of mouse olfaction. *Curr. Protoc. Neurosci.* 1–14. <https://doi.org/10.1002/0471142301.ns0824s48>.Simple
- Youngentob, S.L., 2005. A method for the rapid automated assessment of olfactory function. *Chem. Senses* 30, 219–229. <https://doi.org/10.1093/chemse/bji017>

## FIGURES CAPTIONS

### Table 1. Evaluation of milk volume production and milk composition on lactation day 10.

Milk production was assessed with the pup weight gain after 2h breastfeeding. (CTRL: n=14 litters, HFHS gest-lact: n=8, HFHS 8w + gest-lact: n=8). Statistical comparison was performed with one way ANOVA. Milk composition was studied regarding lipids, proteins and lactose content. (CTRL: n=12 dams, HFHS gest-lact: n=6, HFHS 8w + gest-lact: n=6). \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$  versus CTRL, after Kruskal-Wallis test followed by Dunn's multiple comparison test. Values are expressed as mean  $\pm$  sem. SFA: saturated fatty acid, MUFA monounsaturated fatty acid, PUFA polyunsaturated fatty acid.

### Figure 1. Metabolic consequences of maternal HFHS diet in the offspring.

**A.** Individual pup weight at PND 1. Only litters with 6 +/- 1 pups were weighted (CTRL: n=21 litters, HFHS gest-lact: n=21, HFHS 8w + gest-lact: n=10). **B.** Evolution of male pup weight during lactation (at least 10 pups per group and per day. \*  $p < 0.05$  HFHS gest-lact vs CTRL or HFHS 8w + gest-lact vs CTRL). **C.** Epididymal fat mass in the 3-week-old male offspring (CTRL: n=37 pups, HFHS gest-lact: n=16, HFHS 8w + gest-lact: n=19. Values with different superscripts differ significantly ( $a \neq b$ )). **D.** Leptinemia in the 3-week-old male offspring (CTRL: n=10 pups, HFHS gest-lact: n=6, HFHS 8w + gest-lact: n=6. Values with different superscripts differ significantly ( $a \neq b$ )). **E.** Glycaemia measured after 5h fasting (CTRL: n=18 pups, HFHS gest-lact: n=12, HFHS 8w + gest-lact: n=9). **F.** Glycaemia changes during a i.p. glucose tolerance test (CTRL: n=18 pups, HFHS gest-lact: n=12, HFHS 8w + gest-lact: n=9). Statistical comparison was performed with Kruskal-Wallis test followed by Dunn's multiple comparison test in A, C, D and E; with two-way (diet, time: PND or time after glucose injection) repeated measures ANOVA followed by Bonferroni multiple comparisons in B and F. All data are expressed as mean  $\pm$  sem. PND: postnatal day.

### Figure 2. General olfactory abilities in the offspring assessed with a buried food test.

To verify that mice motivation to eat after 5h fasting was similar between the three groups, the time to retrieve a visible cereal (placed on the bedding surface) was measured (**A**). The time to retrieve a buried cereal (hidden beneath 2 cm of bedding) was then measured during two consecutive trials, and the fastest time over the two trials was taken to assess olfactory performance (**B**). (CTRL: n=54, HFHS gest-lact: n=29, HFHS 8w + gest-lact: n=19). Values with different superscripts differ significantly ( $a \neq b$ ) with Kruskal-Wallis test followed by Dunn's multiple comparison test. Individual data are plotted and mean  $\pm$  sem is represented. **C.** Maternal HFHS diet did not affect spontaneous behavioral pattern. (CTRL: n=26, HFHS gest-lact: n=12, HFHS 8w + gest-lact: n=11).

### Figure 3. Odor-induced sniffing behavior in response to PEA stimulation in a whole-body plethysmograph device.

**A.** Experimental device used to record mouse breathing. Sniffing indexes were calculated before and during stimulation with water (**B**), PEA solution at  $10^{-5}$  M (**C**), PEA solution at  $10^{-4}$  M (**D**). (CTRL: n=39, HFHS gest-lact: n=19, HFHS 8w + gest-lact: n=17). \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$  after two-way (diet, time: before or during stimulation) repeated measures ANOVA followed by Bonferroni multiple comparisons. Boxes represent data included between quartile 1 and quartile 3, separated by the median; and whiskers indicate minimum and maximum values. PEA: phenylethanol.

### Figure 4. EOG responses for the tested odorants are not affected by maternal HFHS diet.

EOG recordings were performed on turbinate III in response to odorant stimulations using phenylethanol (PEA, **A**) or acetophenone (ACE, **B**). Individual data and average dose-

response curve of EOG amplitudes are represented in **1**), and the dose-response characteristics are quantified in **2**). (A: CTRL: n=22, HFHS gest-lact: n=9, HFHS 8w + gest-lact: n=13; B: CTRL: n=19, HFHS gest-lact: n=9, HFHS 8w + gest-lact: n=9). \* p < 0.05 after Kruskal-Wallis test followed by Dunn's multiple comparison test. PEA: phenylethanol, ACE: acetophenone.

#### **Figure 5. Gene expression in the olfactory mucosa.**

qPCR analysis of constituents of the olfactory transduction cascade (**A**) and insulin and leptin receptors (**B**). (CTRL: n=11, HFHS gest-lact: n=6, HFHS 8w + gest-lact: n=6). \* p < 0.05 after Kruskal-Wallis test followed by Dunn's multiple comparison test.

#### **Supplementary figure 1. Overall study design for maternal diet paradigms.**

Timeline for mating, gestation and lactation is represented. Dam's body weight and food intake were monitored twice a week during the whole procedure to watch good health conditions. All experiments carried on the pups were performed just after weaning. EOG: electroolfactogram, MOE: main olfactory epithelium.

#### **Supplementary figure 2. Dams characteristics before gestation.**

**A.** Body weight and caloric intake (A1, A2: Standard diet: n=18, HFHS diet: n=19; A3: Standard diet: n=13, HFHS diet: n=13). **B.** Basal glycaemia and glucose tolerance (Standard diet: n=11, HFHS diet: n=12). Data represents means  $\pm$  sem. \* p < 0.05, \*\* p < 0.01, \*\*\* p < 0.001 after two-way (diet, time) repeated measures ANOVA followed by Bonferroni multiple comparisons or after unpaired t-test.

#### **Supplementary figure 3. Dams body weight and food intake throughout gestation and lactation**

**A.** Body weight (CTRL: n=25, HFHS gest-lact: n=13, HFHS 8w + gest-lact: n=14). **B.** Caloric intake (CTRL: n=22, HFHS gest-lact: n=11, HFHS 8w + gest-lact: n=13). Data represents means  $\pm$  sem. \* p < 0.05 vs CTRL after two-way (diet, time) repeated measures ANOVA followed by Bonferroni multiple comparisons.

#### **Supplementary table 1. Composition of the diets.**

HFHS diet provides more energy per weight than standard diet, with half of the energy coming from lipids. Sucrose constitutes the main part of carbohydrates in HFHS diet. The two diets were purchased from Safe ([www.safe-diets.com](http://www.safe-diets.com)). Standard diet: A03, HFHS diet: 235HF. SFA: saturated fatty acid, MUFA monounsaturated fatty acid, PUFA polyunsaturated fatty acid.

#### **Supplementary table 2. Nucleotide sequence of the primers used for qPCR.**

#### **Supplementary table 3. Detailed lipid composition of maternal milk.**

CTRL: n=12 dams, HFHS gest-lact: n=6, HFHS 8w + gest-lact: n=6. \* p < 0.05, \*\* p < 0.01, \*\*\* p < 0.001 versus CTRL, after Kruskal-Wallis test followed by Dunn's multiple comparison test. Values are expressed as mean  $\pm$  sem. SFA: saturated fatty acid, MUFA monounsaturated fatty acid, PUFA polyunsaturated fatty acid.

Table 1

	CTRL	HFHS gest-lact	HFHS 8w + gest-lact
<b>Milk production (g/pup)</b>	<b>0.14 ± 0.025</b>	<b>0.19 ± 0.017</b>	<b>0.20 ± 0.016</b>
<b>Milk lipids (% weight)</b>	<b>23.42 ± 0.97</b>	<b>26.63 ± 1.35</b>	<b>25.83 ± 1.45</b>
SFA (% total lipids)	56.07 ± 1.29	48.98 ± 1.57***	43.25 ± 1.58**
MUFA (% total lipids)	25.61 ± 0.99	45.47 ± 1.39***	43.30 ± 1.51**
PUFA (% total lipids)	18.32 ± 0.41	13.55 ± 0.22**	13.46 ± 0.35**
- n-6 (% total PUFA)	16.45 ± 0.38	12.42 ± 0.21**	12.27 ± 0.32**
- n-3 (% total PUFA)	1.78 ± 0.05	1.03 ± 0.02**	1.10 ± 0.31**
- n-6 / n-3 ratio	9.27 ± 0.22	12.10 ± 0.32***	11.22 ± 0.31**
<b>Milk proteins (% weight)</b>	<b>21.58 ± 0.99</b>	<b>20.86 ± 0.53</b>	<b>21.25 ± 1.22</b>
<b>Milk lactose (% weight)</b>	<b>3.10 ± 0.43</b>	<b>2.90 ± 0.37</b>	<b>3.29 ± 0.74</b>

Figure 1

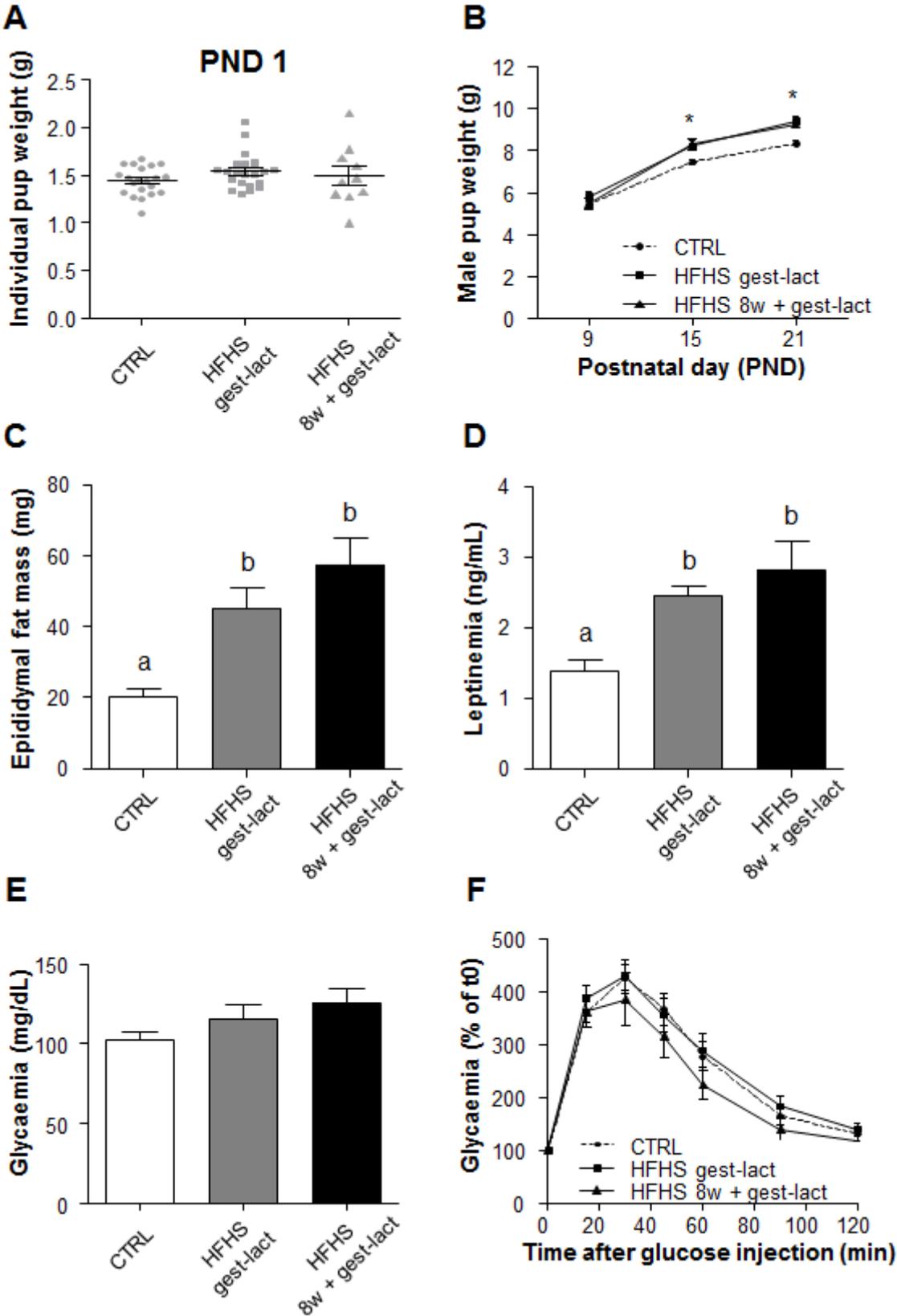


Figure 2

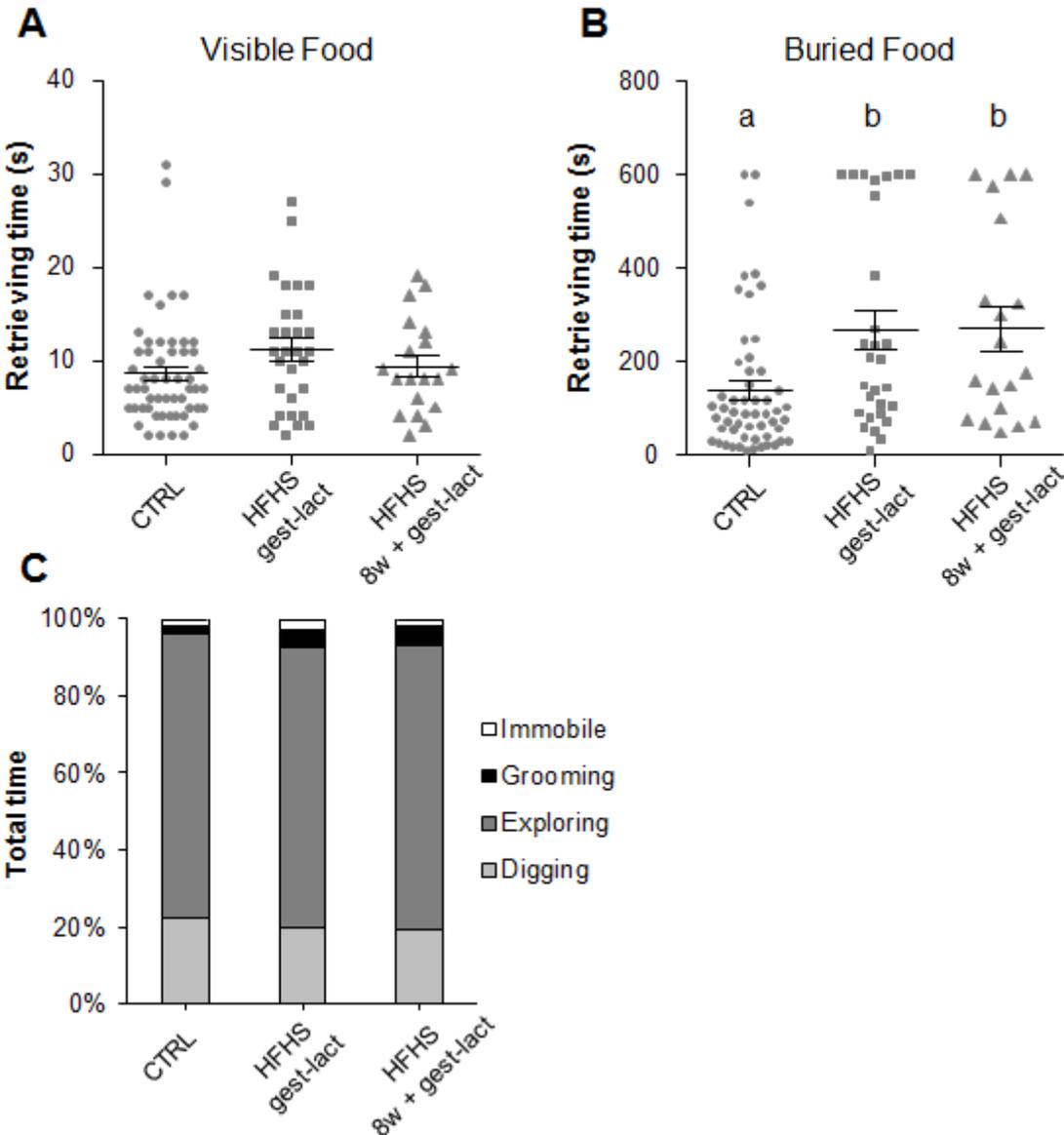


Figure 3

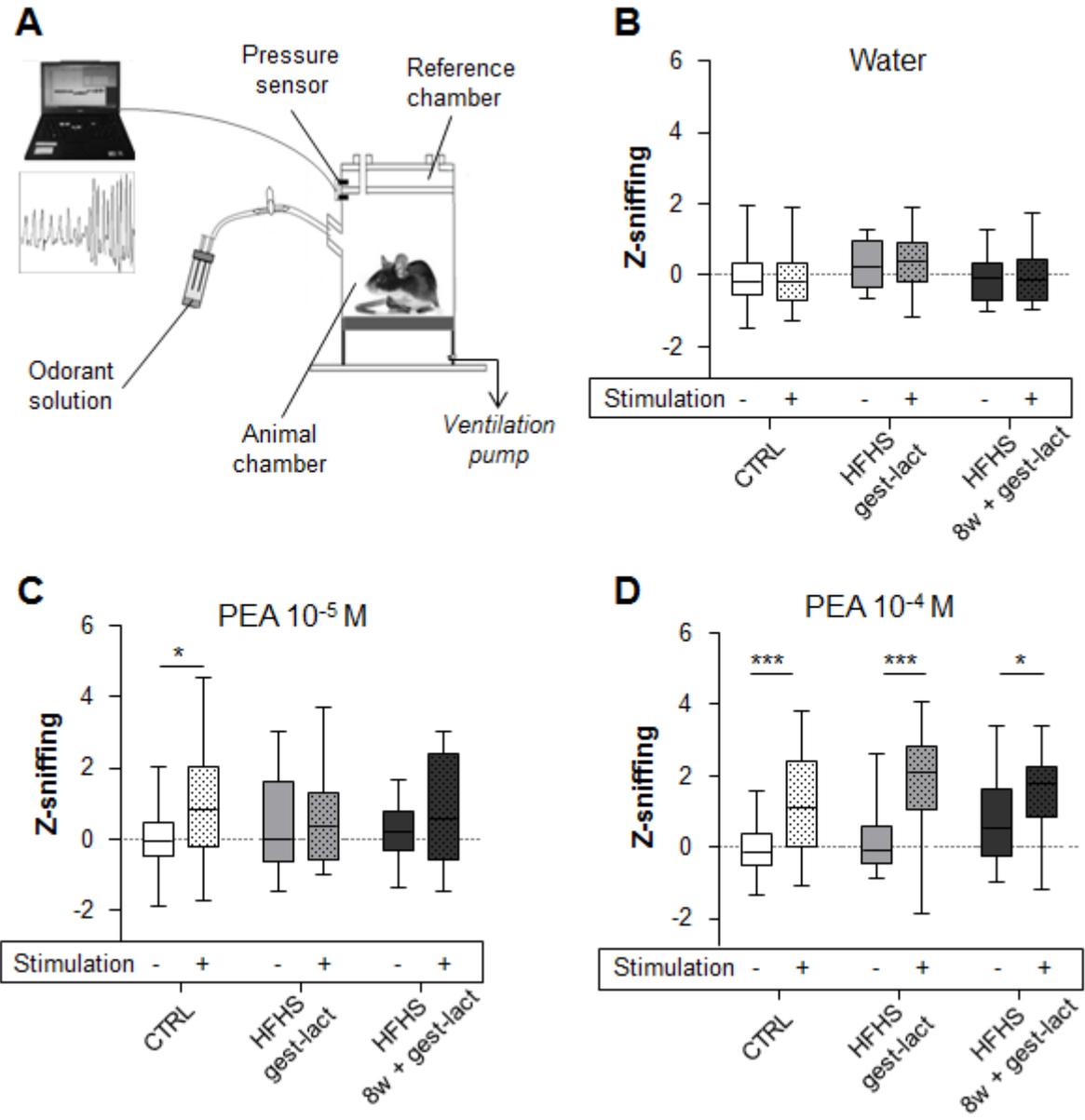


Figure 4

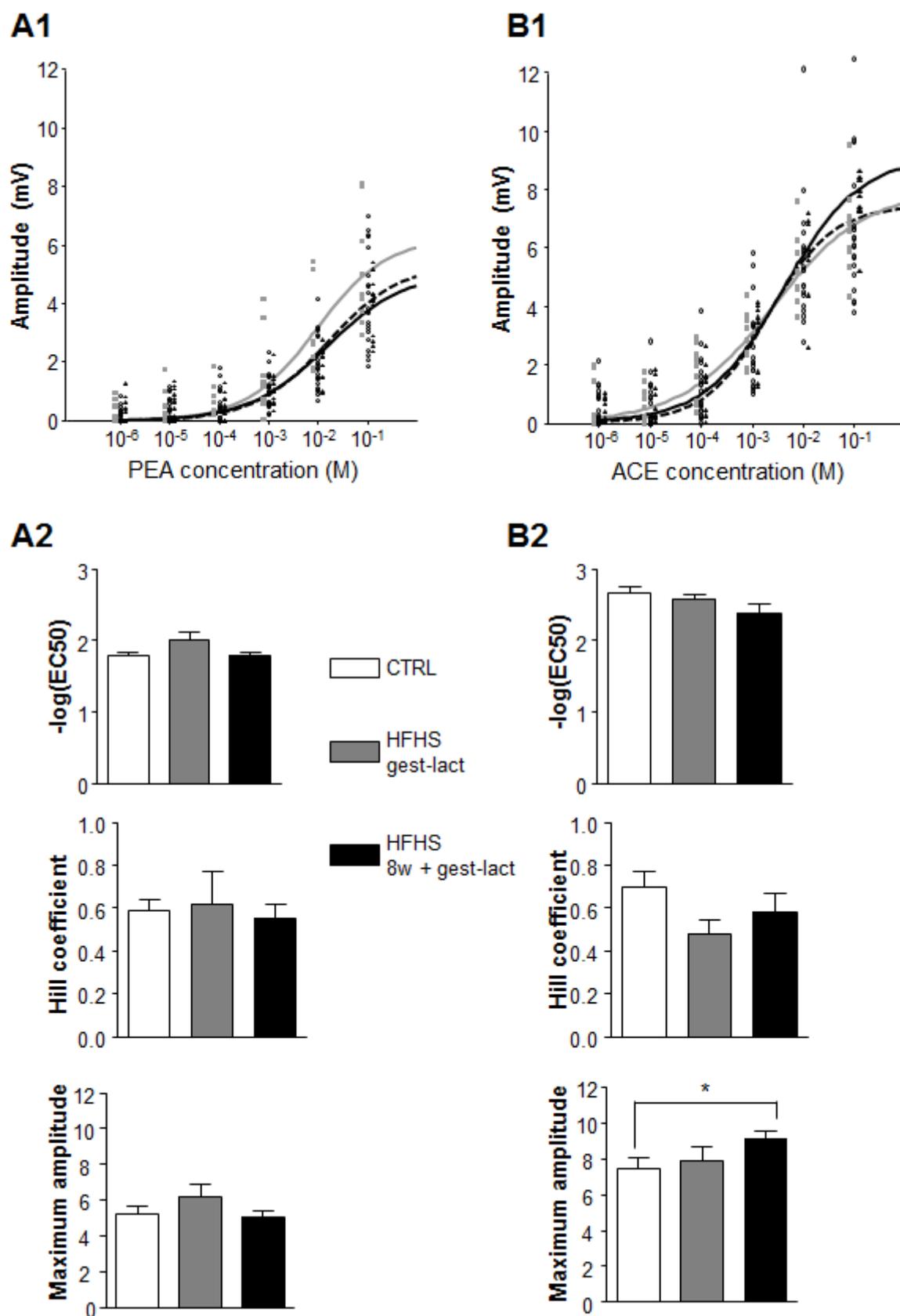
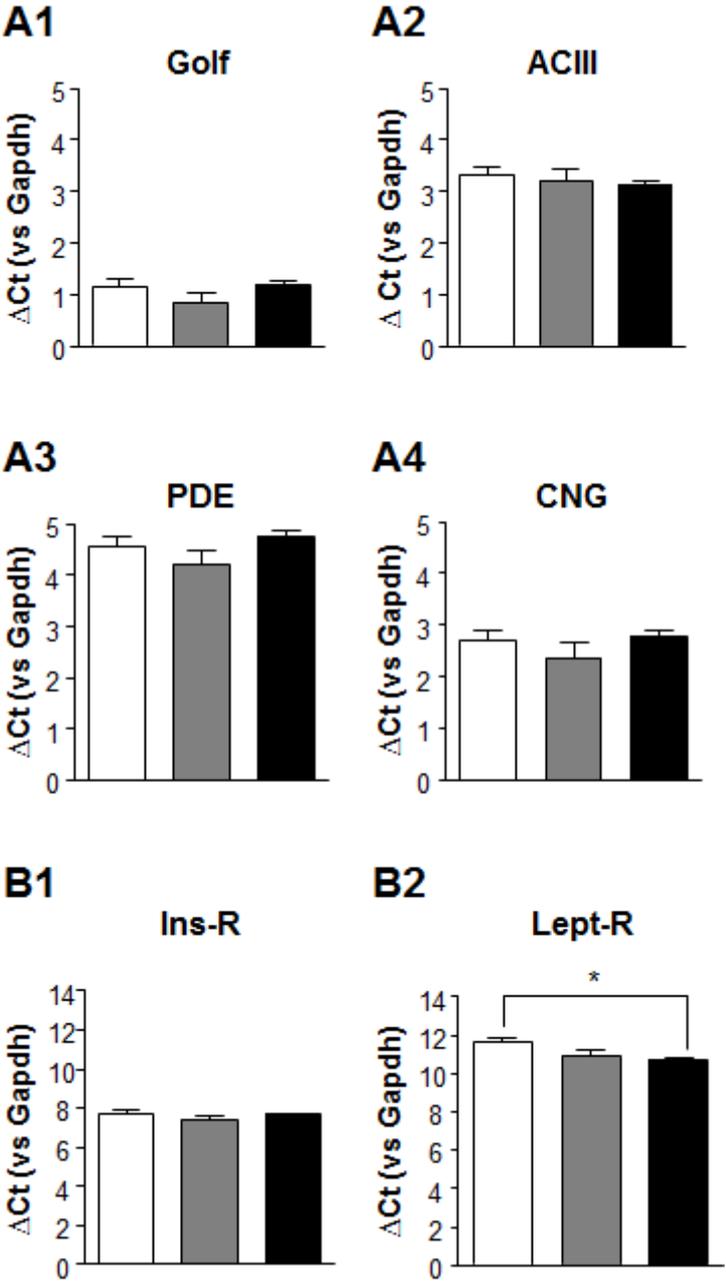
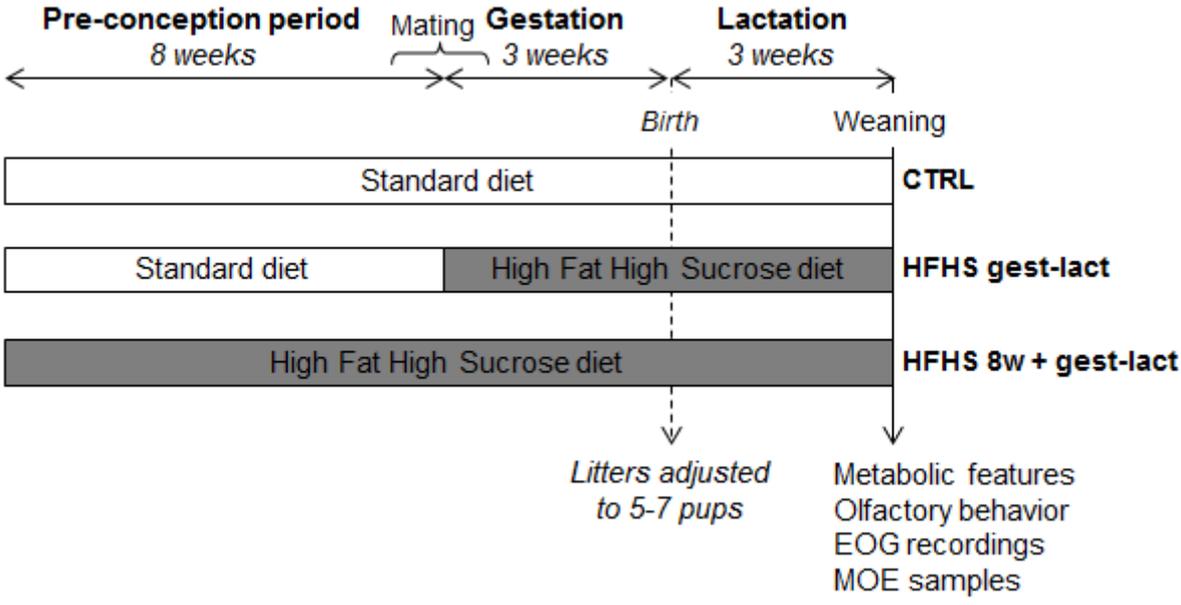


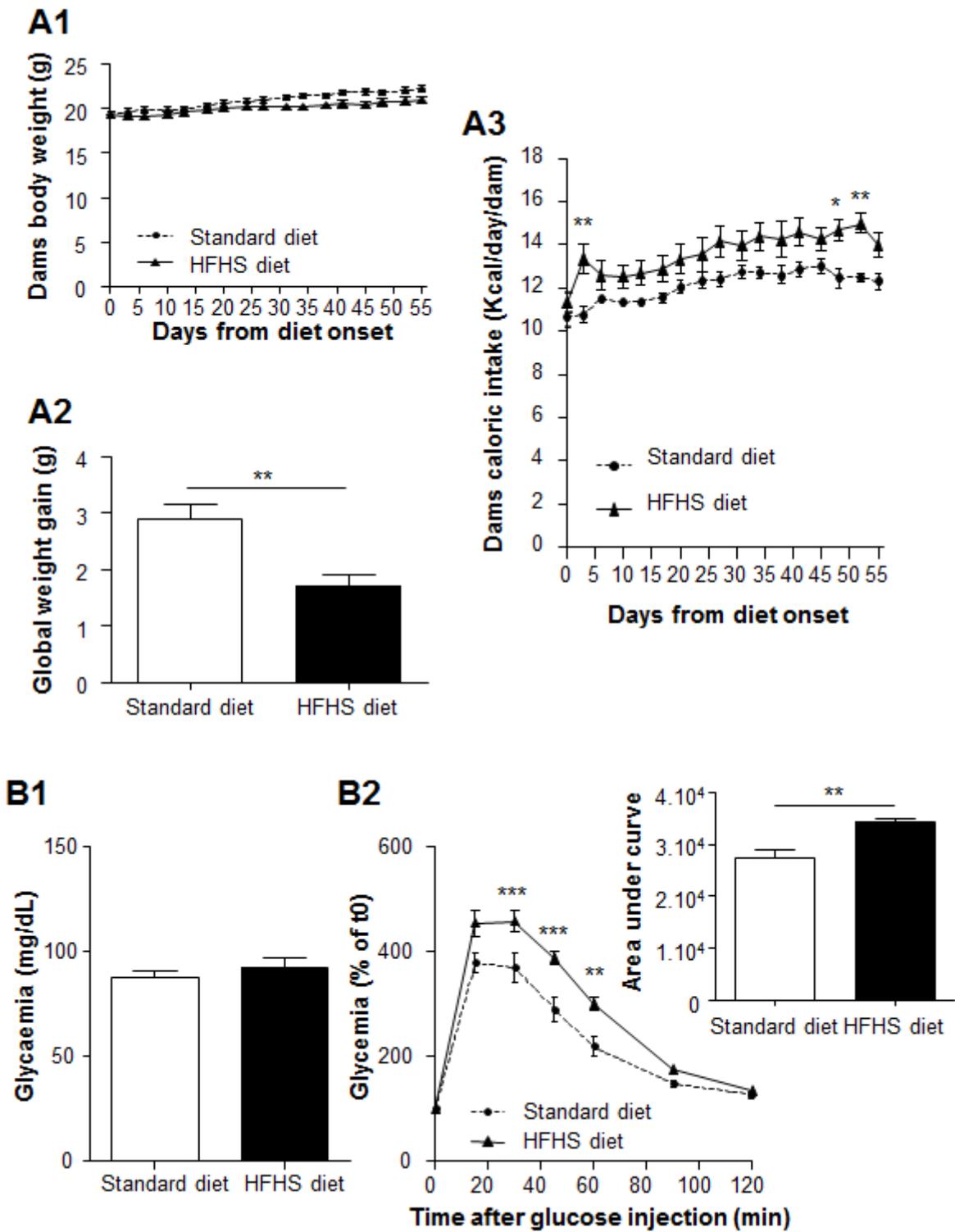
Figure 5



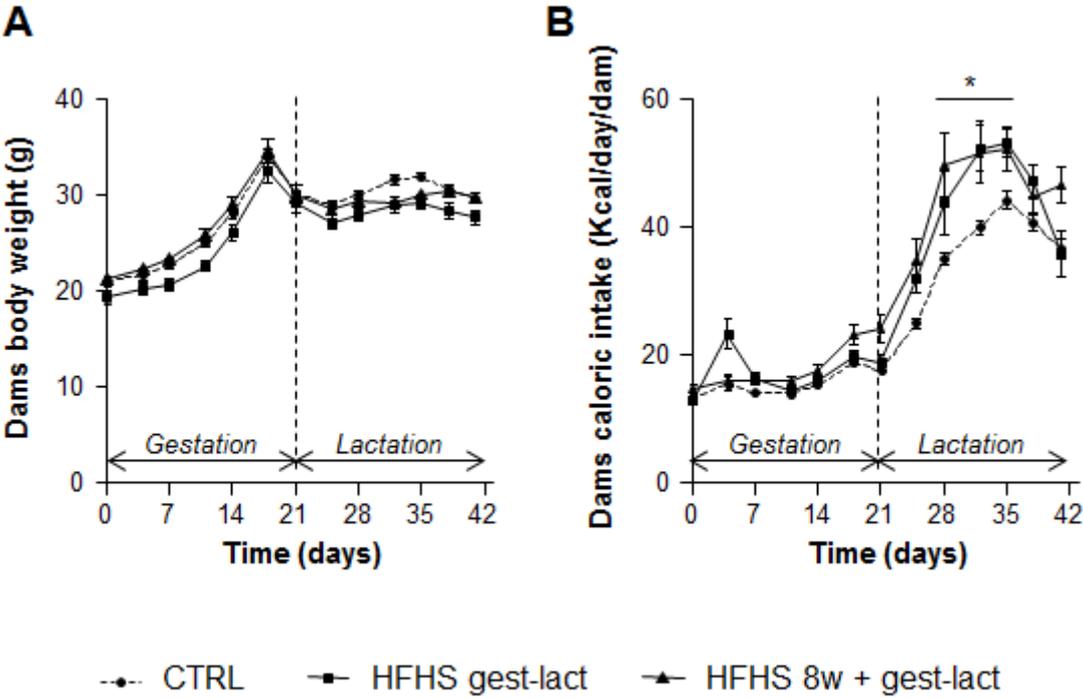
Supplementary figure 1



Supplementary figure 2



Supplementary figure 3



**Supplementary table 1**

	<b>Standard diet</b>	<b>HFHS diet</b>
<b>Total energy (Kcal/kg)</b>	<b>3.4</b>	<b>4.4</b>
<b>Carbohydrates (% total energy)</b>	<b>61.3</b>	<b>38.5</b>
- starch (% carbohydrates)	88.5	30.8
- sucrose (% carbohydrates)	11.5	69.2
<b>Lipids (% total energy)</b>	<b>13.5</b>	<b>46.0</b>
- SFA (% lipids)	18.6	37.1
- MUFA (% lipids)	23.6	44.7
- PUFA (% lipids)	57.8	18.2
- <i>n</i> -6/ <i>n</i> -3	7.5	10.8
<b>Proteins (% of total energy)</b>	<b>25.2</b>	<b>15.5</b>

**Supplementary table 2**

	<b>Forward</b>	<b>Reverse</b>
<i>Gapdh</i>	CCTGGAGAAACCTGCCAAGTAT	CTGTTGAAGTCGCAGGAGACAA
<i>Golfa</i>	CTTGGCAGGGAAGTCAAAAATC	GGCTGGTGCTGATCCTCAAGAA
<i>ACIII</i>	AGGCGACTGTTACTACTGCATCTG	ACGTACGAGATGGCCTCTACCA
<i>CNGA2</i>	GGCACCAAAAAGAAATTTGAACTG	CAGGCTCTGGCTACCACCAGA
<i>PDE1C</i>	GCAGCAGAACGGTGACTTGA	TCCGGTGTTGGAGTGATCCT
<i>Ins-R</i>	TGCTCATGCCCTAAGACTGACT	CCACGTTGTGCAGGTAATCC
<i>Lept-R</i>	TGGCTTAGAATTCCCTGCAATGT	GCTTGTCGATAGCATCTTTGGT

Supplementary table 3

	CTRL	HFHS gest-lact	HFHS 8w + gest-lact
<b>Total SFA</b>	<b>56.07 ± 1.29</b>	<b>48.98 ± 1.57<sup>***</sup></b>	<b>43.25 ± 1.58<sup>**</sup></b>
10:0	3.52 ± 0.15	1.87 ± 0.19 <sup>***</sup>	2.08 ± 0.18 <sup>**</sup>
12:0	7.11 ± 0.27	3.40 ± 0.33 <sup>**</sup>	3.76 ± 0.27 <sup>**</sup>
14:0	11.31 ± 0.38	5.59 ± 0.49 <sup>***</sup>	6.16 ± 0.38 <sup>**</sup>
15:0	0.10 ± 0.004	0.08 ± 0.002 <sup>**</sup>	0.07 ± 0.003 <sup>***</sup>
16:0	31.31 ± 0.63	26.21 ± 0.64 <sup>**</sup>	26.94 ± 0.72 <sup>*</sup>
17:0	0.09 ± 0.004	0.14 ± 0.005 <sup>**</sup>	0.15 ± 0.01 <sup>***</sup>
18:0	2.53 ± 0.05	3.61 ± 0.22 <sup>**</sup>	4.01 ± 0.29 <sup>***</sup>
20:0	0.09 ± 0.01	0.09 ± 0.004	0.09 ± 0.01
<b>Total MUFA</b>	<b>25.61 ± 0.99</b>	<b>45.47 ± 1.39<sup>***</sup></b>	<b>43.30 ± 1.51<sup>**</sup></b>
14:1	0.15 ± 0.01	0.05 ± 0.01 <sup>**</sup>	0.06 ± 0.01 <sup>**</sup>
16:1 (n-9)	0.26 ± 0.01	0.43 ± 0.01 <sup>***</sup>	0.41 ± 0.02 <sup>**</sup>
16:1 (n-7)	2.45 ± 0.10	2.64 ± 0.10	2.44 ± 0.13
18:1 (t)	0.46 ± 0.05	0.60 ± 0.03 <sup>**</sup>	0.50 ± 0.02
18:1 (n-9)	19.39 ± 0.80	37.15 ± 1.20 <sup>***</sup>	35.49 ± 1.24 <sup>**</sup>
18:1 (n-7)	2.24 ± 0.08	3.59 ± 0.08 <sup>***</sup>	3.44 ± 0.11 <sup>**</sup>
20:1 (n-9)	0.59 ± 0.02	0.95 ± 0.04 <sup>**</sup>	0.90 ± 0.04 <sup>**</sup>
24:1 (n-9)	0.08 ± 0.003	0.06 ± 0.002 <sup>*</sup>	0.06 ± 0.004
<b>Total PUFA</b>	<b>18.32 ± 0.41</b>	<b>13.55 ± 0.22<sup>**</sup></b>	<b>13.46 ± 0.35<sup>**</sup></b>
20:3 (n-9)	0.09 ± 0.01	0.10 ± 0.01	0.09 ± 0.01
Total n-6	16.45 ± 0.38	12.42 ± 0.21 <sup>**</sup>	12.27 ± 0.32 <sup>**</sup>
18:2 (n-6)	13.91 ± 0.33	9.99 ± 0.19 <sup>**</sup>	10.05 ± 0.30 <sup>**</sup>
18:3 (n-6)	0.20 ± 0.01	0.21 ± 0.02	0.17 ± 0.01
20:2 (n-6)	0.76 ± 0.01	0.61 ± 0.02 <sup>**</sup>	0.61 ± 0.03 <sup>**</sup>
20:3 (n-6)	0.63 ± 0.02	0.55 ± 0.02	0.48 ± 0.03 <sup>**</sup>
20:4 (n-6)	0.74 ± 0.03	0.84 ± 0.04	0.76 ± 0.07
22:4 (n-6)	0.21 ± 0.01	0.22 ± 0.01	0.21 ± 0.02
Total n-3	1.78 ± 0.05	1.03 ± 0.02 <sup>**</sup>	1.10 ± 0.31 <sup>**</sup>
18:3 (n-3)	1.01 ± 0.03	0.63 ± 0.02 <sup>***</sup>	0.71 ± 0.05 <sup>**</sup>
20:5 (n-3)	0.23 ± 0.01	0.14 ± 0.01 <sup>**</sup>	0.13 ± 0.01 <sup>***</sup>
22:5 (n-3)	0.22 ± 0.01	0.12 ± 0.004 <sup>**</sup>	0.12 ± 0.004 <sup>***</sup>
22:6 (n-3)	0.33 ± 0.02	0.14 ± 0.01 <sup>**</sup>	0.14 ± 0.01 <sup>**</sup>
<i>Ratio n-6/n-3</i>	<i>9.27 ± 0.22</i>	<i>12.10 ± 0.32<sup>***</sup></i>	<i>11.22 ± 0.31<sup>**</sup></i>

## Annexe 2 : Liste des communications scientifiques

---

Communications affichées (poster) :

- Congrès de la Société Française des Neurosciences : NeuroFrance 2017 (Bordeaux)
- Colloque de l'Ecole Doctorale : Forum des Jeunes Chercheurs 2017 (Dijon)
- Congrès de l'Association Américaine des Sciences de la Chémoréception : AChemS 2018 (Bonita Springs, Floride)

Communications orales :

- Congrès de la Société française de Neuroendocrinologie : SNE 2017 (Dijon)
- Colloque de l'Ecole Doctorale : Forum des Jeunes Chercheurs 2018 (Besançon)

# Annexe 3 : Liste des enseignements

---

Dans le cadre de mon contrat doctoral, j'ai eu l'opportunité d'encadrer des travaux pratiques de physiologie animale à l'UFR SVTE de l'Université de Bourgogne-Franche Comté.

- **Monitorat 2016-2017 : 64h (2<sup>ème</sup> et 3<sup>ème</sup> année de Licence)**

Thèmes abordés :

- L'automatisme du cœur de grenouille
- Spirographie chez l'homme
- Les éléments figurés du sang
- La pression artérielle et sa régulation
- Activité du nerf sciatique chez la grenouille

- **Monitorat 2017-2018 : 64h (3<sup>ème</sup> année de Licence)**

Thème abordé : activité du nerf sciatique chez la grenouille

**Résumé** : L'alimentation maternelle conditionne la santé métabolique et cardiovasculaire de la progéniture, mais l'impact sur les systèmes sensoriels reste peu étudié. L'olfaction joue un rôle comportemental crucial pour l'évitement des dangers et pour la prise alimentaire. Dès le plus jeune âge, les odeurs participent à l'établissement des préférences alimentaires, qui influencent les habitudes alimentaires de l'adulte. Le système olfactif repose sur le fonctionnement de neurones qui se développent pendant la vie embryonnaire, continuent leur maturation après la naissance et sont continuellement régénérés au cours de la vie. Ces neurones sont en permanence modulés par les facteurs métaboliques. Les patients atteints de troubles métaboliques ont plus de risques de présenter des altérations de la perception des odeurs, et l'exposition à une alimentation de type obésogène ou diabétogène induit des perturbations olfactives chez le rongeur.

Le but de cette thèse était d'explorer les effets d'une exposition périnatale au gras et au sucre, à travers l'alimentation maternelle pendant les périodes de préconception, gestation et lactation, sur la physiologie olfactive de souris juvéniles.

L'alimentation grasse et sucrée (*high-fat high-sucrose*, HFHS) a modifié la composition lipidique du lait maternel. La caractérisation métabolique des petits a révélé un surpoids, un excès de masse grasse épидidymaire et une hyperleptinémie chez les petits provenant d'une mère sous alimentation HFHS. Les capacités olfactives évaluées lors d'un test de nourriture enfouie et par mesure du comportement de flairage induit par les odeurs étaient altérées chez les petits dont la mère a été exposée à l'alimentation HFHS. Cependant, nos résultats n'ont pas montré de modification de la sensibilité de l'épithélium olfactif (EO) ou de l'expression des gènes codant pour les éléments de la cascade de transduction olfactive. L'exploration du traitement central du signal olfactif a révélé un impact de l'alimentation maternelle HFHS sur le degré de ramification dendritique des interneurons du bulbe olfactif. En revanche, l'activation des neurones dans le cortex piriforme après une exposition odorante n'était pas modifiée.

Ainsi, l'alimentation maternelle HFHS pendant les périodes de développement des petits induit chez les mâles des altérations de la perception olfactive, sans perturbation de la détection des odeurs par l'EO, mais associées à des modifications neuronales dans les structures olfactives centrales. La leptine, hormone métabolique connue pour son action sur l'olfaction et sur le développement neuronal, pourrait être à l'origine de ces déficits olfactifs.

**Mots clés** : *olfaction, alimentation maternelle, comportement, pléthysmographie, électroolfactogramme, neurones olfactifs.*

**Abstract**: The influence of maternal diet on progeny's health has been thoroughly investigated regarding metabolic and cardiovascular diseases, but the impact on sensory systems remains unknown. Olfaction is of great behavioral importance for avoiding hazards and for feeding behavior. In childhood especially, olfaction participates in establishing food preferences, which partly determine adult eating habits. The olfactory system is made of sensory neurons that develop during the embryonic life, pursue their maturation after birth and are continuously regenerated over life. Olfactory neurons activity can be modulated by metabolic factors. Patients with metabolic disorders are at risk of impaired olfactory sensitivity. Adult mice exposed to an obesogenic or diabetogenic diet exhibit disrupted olfactory behavior.

The aim of this thesis was to investigate the effect of a perinatal exposure to fat and sugar, through maternal diet during preconception, gestation and lactation, on the olfactory system of young mice.

Maternal high fat high sugar (HFHS) diet modified milk lipids composition. When investigating pups' metabolic phenotype, overweight, increased epididymal fat and hyperleptinemia were revealed in pups born from dams fed with the HFHS diet. Olfactory abilities were assessed in a buried food test and by measuring odor-induced sniffing behavior and were disrupted in the progeny of HFHS diet fed dams. However, olfactory epithelium sensitivity and gene expression of constituents of the olfactory transduction cascade were not affected by maternal HFHS diet. When investigating olfactory central processing, dendritic complexity of interneurons in the olfactory bulb was found to be affected by maternal HFHS diet. Meanwhile, neuronal activation in piriform cortex was not altered.

These results show that maternal HFHS diet during pups' development alters olfactory perception in male progeny, without impairing odor detection by the OE, and associated with neuronal modifications in olfactory central areas. Leptin is a metabolic hormone known to influence olfaction and neurons development which could have induced the olfactory defects.

**Keywords**: *olfaction, maternal diet, behavior, plethysmography, electroolfactogram, olfactory neurons.*