



HAL
open science

Impact de l'apport alimentaire en acides gras polyinsaturés n-3 sur la physiologie du système olfactif périphérique chez la jeune souris

Vanessa Soubeyre

► To cite this version:

Vanessa Soubeyre. Impact de l'apport alimentaire en acides gras polyinsaturés n-3 sur la physiologie du système olfactif périphérique chez la jeune souris. Biochimie, Biologie Moléculaire. Université Bourgogne Franche-Comté, 2021. Français. NNT : 2021UBFCK053 . tel-04121629

HAL Id: tel-04121629

<https://theses.hal.science/tel-04121629v1>

Submitted on 8 Jun 2023

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'ETABLISSEMENT UNIVERSITE BOURGOGNE FRANCHE-COMTE

PREPAREE AU CENTRE DES SCIENCES DU GOUT ET DE L'ALIMENTATION

Ecole doctorale n°554

Environnement -Santé

Doctorat de Neurosciences

Par

Vanessa SOUBEYRE

Impact de l'apport alimentaire en acides gras polyinsaturés n-3 sur la physiologie du système olfactif périphérique chez la jeune souris

Thèse présentée et soutenue à Dijon, le 06 Décembre 2021

Composition du Jury :

Pr. Michel NARCE	Professeur des universités (UBFC) – Président
Dr. Corinne JOFFRE	Chargée de recherche (INRAE) - Rapporteuse
Pr. Alain TREMBLEAU	Professeur des universités (Sorbonne Université) - Rapporteur
Dr. Nicolas MEUNIER	Directeur de recherche (INRAE) - Examineur
Dr Anne Marie LE BON	Directrice de recherche (INRAE) - Directrice de thèse
Dr Xavier GROSMAITRE	Directeur de recherche (CNRS) - Co-directeur de thèse

Titre : Impact de l'apport alimentaire en acides gras polyinsaturés n-3 sur la physiologie du système olfactif périphérique chez la jeune souris

Mots clés : *Olfaction, muqueuse olfactive, acides gras, électro-olfactogramme, comportement olfactif*

Résumé : L'olfaction joue un rôle majeur dans la détection des signaux chimiques volatils présents dans l'environnement et déclenche des comportements tels que la prise alimentaire, les interactions sociales ou l'évitement d'un danger. Les recherches menées ces dernières années suggèrent que les statuts nutritionnel et métabolique des individus peuvent avoir une influence sur leurs capacités olfactives. Des troubles olfactifs ont ainsi été observés chez des personnes atteintes de pathologies comme l'obésité et le diabète ainsi que chez des rongeurs exposés à des régimes obésogène ou diabétogène. Les mécanismes physiologiques à l'origine de ces dysfonctionnements ne sont pas connus. Une des hypothèses proposées est qu'un déséquilibre nutritionnel, notamment en lipides, perturberait le fonctionnement du système olfactif périphérique. Dans ce contexte, l'objectif de cette thèse était de caractériser l'impact de régimes déséquilibrés en acides gras polyinsaturés (AGPI) de la série n-3 sur la physiologie du système olfactif périphérique chez la souris.

Pour cela, des souris femelles ont été nourries *ad libitum* avec des régimes déficient (LOW) ou supplémenté (HIGH) en AGPI n-3 pendant la période périnatale. Les souriceaux mâles ont ensuite consommé les mêmes régimes jusqu'à l'âge de 8 semaines. Des tests de comportement olfactif ont été réalisés chez la progéniture à l'âge de 3 et 8 semaines

La composition de la muqueuse olfactive en acides gras ainsi que l'expression de gènes impliqués dans différentes voies cellulaires ont été analysées. Les réponses électrophysiologiques de la muqueuse olfactive à des odorants ont également été mesurées.

Les résultats montrent que dès l'âge de 3 semaines, les régimes LOW et HIGH modifient significativement le profil des acides gras de la muqueuse olfactive de la progéniture. Ces régimes retardent également la maturation des neurones olfactifs sensoriels (NSO) mais n'affectent pas la neurogénèse. De plus, le régime déficient en AGPI n-3 altère le traitement de l'information olfactive au niveau périphérique en réduisant l'expression de certains acteurs de la cascade de transduction du signal olfactif. Toutefois, les capacités olfactives des jeunes souris ne sont pas altérées.

En conclusion, ces travaux démontrent que les capacités olfactives des souris nourries avec des régimes déséquilibrés en AGPI n-3 pendant la période périnatale et jusqu'à l'âge adulte sont maintenues malgré des changements moléculaires et fonctionnels significatifs au niveau périphérique. Ces observations confortent l'idée que le système olfactif possède des facultés d'adaptation pour préserver le sens de l'odorat.

Title : Impact of dietary intake of n-3 polyunsaturated fatty acids on the physiology of the peripheral olfactory system in young mice

Keywords : *olfaction, olfactory mucosa, fatty acid, electroolfactogramm, olfactory behavior*

Abstract : Olfaction plays a major role in the detection of volatile chemical signals present in the environment and triggers behaviors such as food intake, social interactions or danger avoidance. Recent studies suggested that nutritional and metabolic status of individuals may influence their olfactory capacities. Olfactory disorders have been observed in people with pathologies such as obesity and diabetes as well as in rodents exposed to obesogenic or diabetogenic diets. The physiological mechanisms underlying these dysfunctions are not known. One hypothesis is that a nutritional imbalance in lipids might alter the functioning of the peripheral olfactory system. In this context, the objective of this thesis was to characterize the impact of diets unbalanced in n-3 polyunsaturated fatty acid (PUFAs) on the physiology of the peripheral olfactory system in mice

To this end, female mice were fed *ad libitum* diets either deficient (LOW diet) or supplemented (HIGH diet) in n-3 PUFA during the perinatal period. Male offspring were then fed with the same experimental diets until 8 weeks of age. Olfactory behavior tests were performed in the young mice at the age of 3 and 8 weeks.

The fatty acid composition of olfactory mucosa, as well as the expression of genes involved in different cellular pathways, were analyzed. The electrophysiological responses to odorants were also measured in the olfactory mucosa.

Our data showed that the LOW and HIGH diets significantly modified the fatty acid profiles of the olfactory mucosa of the offspring as soon as 3 weeks old. These diets also delayed olfactory sensory neurons (OSN) maturation but did not affect neurogenesis. In addition, the n-3 PUFA-deficient diet impaired the olfactory information processing at the peripheral level by reducing the expression of some actors involved in the olfactory signal transduction cascade. However, the olfactory abilities of young mice were not altered.

In conclusion, our work showed that olfactory abilities of mice fed diets unbalanced in n-3 PUFA from the perinatal period to adulthood were maintained despite molecular and functional changes at the peripheral level. These observations support the idea that the olfactory system exhibits adaptive faculties to ensure a sense of smell continuity

“You don’t have to see the whole staircase. Just take the first step.”

Martin Luther King

Remerciements

Lorsque à l'automne 2017 je me suis engagée dans ce travail de thèse, je n'avais aucune idée comme le monde allait changer. Aujourd'hui, ce projet se finalise et je suis heureuse de pouvoir remercier ici toutes les personnes qui m'ont accompagnée lors de cette aventure.

En premier lieu, je souhaite remercier mes directeurs de thèse, Anne-Marie Le Bon et Xavier Grosmaître. Je souhaiterais vous exprimer toute ma gratitude d'avoir accepté de diriger ces travaux de recherche.

Anne Marie, je te remercie infiniment pour ta confiance et ton soutien sans faille pendant ces 4 années. Tes conseils toujours judicieux m'ont permis d'évoluer et de prendre du recul à chaque fois que cela était nécessaire.

Xavier, je te remercie de m'avoir permis d'entreprendre ce projet qui comptait tant pour moi, d'en avoir suivi la progression et d'avoir toujours su trouver les mots justes au cours de ces années.

Anne Marie et Xavier, je vous serai toujours reconnaissante pour l'accomplissement de ce projet !

Je remercie chaleureusement les membres du jury. Merci au Dr. Corinne Joffre et Pr. Alain Trembleau d'avoir accepté d'être les rapporteurs de mes travaux de thèse et au Dr. Nicolas Meunier et Pr. Michel Narce d'en être les examinateurs. Je souhaite spécialement remercier Alain Trembleau de m'avoir toujours encouragé à me dépasser, à ne pas perdre de vue mes objectifs que ce soit lors de mes années « Jussieu » ou plus récemment pour me lancer dans l'aventure de la thèse.

Je souhaite également remercier Lionel Bretillon, alors directeur du CSGA, de m'avoir permis de continuer ce projet dès que cela a été possible après le premier confinement au printemps 2020.

Un grand merci également à Caroline Dubacq, Nyiazi Acar et David Jarriault d'avoir participé à mes comités de suivi de thèse et pour les discussions enrichissantes que nous avons eues au cours de ces années. Ces échanges ont contribué à l'avancée de mes travaux de thèse.

Avec la pandémie, il a fallu s'adapter, changer les priorités. David, c'est dans ce contexte que je souhaite particulièrement te remercier. Merci de m'avoir guidée dans la réalisation des expériences de comportement olfactif et d'électro-olfactogrammes, sans oublier le dépannage à distance avec Axioscope et Matlab ! Toute cette période a été très enrichissante.

Je souhaite également remercier Laetita Merle qui a contribué pleinement à la réalisation de ce projet, en particulier dans la réalisation des tests de flairage par pléthysmographie ainsi que dans la réalisation d'une partie des électro-olfactogrammes. Je te remercie pour tout le temps que tu as consacré à ce projet alors que tu menais en parallèle ton propre projet de thèse.

Mes remerciements vont également à Bruno Patris pour nous avoir permis tout au long de ce projet (et encore plus pendant la pandémie) de bénéficier de ses colonies d'animaux. Merci d'avoir été à l'écoute, quant au lendemain du premier confinement, tu nous as permis de relancer notre projet.

Je souhaite également remercier la plateforme ChemoSens et Stéphane Grégoire pour votre contribution au versant « lipides » de ce projet. Merci Stéphane pour tes encouragements et d'avoir toujours pris le temps de discuter quand je venais du côté « INRA » pour faire les extractions de « cils ».

Je tiens à remercier Pascale Wrinckler et Jean-Marie Perrier-Cornet pour leur aide et leur expertise dans la mise en place des expériences de fluidité membranaire.

Je souhaite également remercier Sylvie Chaudy. Merci à toi pour ton aide lors des matinées « dissection » mais aussi pour ton écoute et tes encouragements.

Mes remerciements vont aussi à Sylvie Grall. Sylvie, merci d'avoir été là. Je te remercie pour tes encouragements et bien sûr pour nos si nombreuses discussions que ce soit au sujet de la « thèse » ou de la vie tout simplement. Je te souhaite le meilleur pour la suite de tes projets.

Claire, Fabienne, Frédérique et Jean, merci à vous pour nos repas partagés et nos idées débattues. Sans oublier nos nombreux échanges, Cédric, Chloé, Emmanuelle et Selma !

Je souhaite chaleureusement remercier Anne et Martin. Merci pour votre engagement dans le suivi des colonies tout au long du projet. Anne pour ta bienveillance et ton écoute tout au long de ces années.

A l'équipe que j'ai rejoint à Montpellier, qui m'entend parler de ma fin de thèse depuis un an...

Je souhaite dédier ces travaux à mon grand-père. Amoureux de la nature, il a su très tôt éveiller ma curiosité. Je me souviens encore du jour où il m'a offert un objet très cher à son cœur, un microscope datant des années 1930 que ses parents lui avaient offert alors qu'il n'était qu'un enfant. Avant son départ, nous avons souvent parlé des expériences menées dans le cadre de ce projet. Je sais qu'il aurait été heureux de partager ce moment avec nous.

Tout cet investissement n'aurait pas été possible sans le soutien sans faille de mes parents et de mes sœurs. Merci de m'avoir toujours soutenue dans mes choix et encouragée au cours de ces années. Sans oublier votre aide dans la gestion des enfants... Je sais que par moment la pression était forte !

Je voudrais également remercier ici mes amis chers. Ceux qui m'accompagnent depuis de nombreuses années et qui savent à quel point ce projet comptait à mes yeux.

Je citerais en premier Tim et Chris, mes « amis anglais ». Merci à vous de m'avoir donné ma chance dans un pays qui n'était pas le mien alors que je sortais tout juste de « l'école ». Votre bienveillance et votre confiance m'ont permis de revenir trois ans plus tard enrichie d'un master et d'une expérience professionnelle. C'était il y a tout juste 20 ans!

A mes amies de toujours : Valérie et Hélène... que d'épopées depuis les années 1990... vous êtes toujours là et avez suivi avec intérêt l'avancée de ce projet ! Merci d'être vous.

A toi Do, que de chemins parcourus pour toutes les deux. Nos vies ne nous permettent pas de nous voir souvent, mais tu sais que tu as place particulière dans mon cœur.

A Julie et Mathéa, mes chères amies de l'époque « JUSSIEU ». A ces innombrables discussions où nous refaisons le monde ; à tous nos rires, assises à la terrasse d'un café parisien. Merci à vous d'avoir toujours été là dans les moments heureux et les autres. Vivement que nous puissions nous retrouver !

A Céline. Je te l'ai déjà dit, j'ai pour toi une très grande estime et beaucoup d'admiration. Tu es une amie précieuse.

A la bande d'Hauteville, Silvia, Anne Laure, Seb et Philippe, à nos soirées et nos fou-rires.

Et pour tous les moments partagés, les plongées, le ski, le surf, les repas autour d'une table, les discussions interminables. A Elo et JB. Merci infiniment d'être là.

Enfin à ma famille. Tim, Loane. Voilà c'est fini ! Je vous remercie de m'avoir aidé à tenir le cap. Il a eu des moments durs mais vous avez été attentifs et soucieux de me voir terminer ce projet. Si je devais vous donner un conseil, c'est de croire en vous et d'être accompagné de personnes animées de mêmes sentiments.

Enfin à toi Vincent. Quand j'ai commencé ce projet, nous étions loin d'imaginer tous les changements qui auraient lieu dans nos vies. On dit souvent qu'il faut savoir se lancer, réaliser ce qui nous tient à cœur. Je crois que c'est ce qu'il s'est passé pour nous. Merci d'avoir su m'écouter et m'encourager. Surtout merci de me rendre la vie si belle et agréable, d'être là tout simplement.

Table des matières

LISTE DES ABBREVIATIONS	1
LISTE DES ILLUSTRATIONS	7
FIGURES	8
TABLEAUX	10
PREAMBULE	11
<u>PARTIE 1 : INTRODUCTION</u>	15
<u>Chapître 1</u> : Le système olfactif chez le rongeur	17
1. Le système olfactif périphérique de la souris	17
2. Anatomie de la muqueuse olfactive	18
a. Le mucus	18
b. Les neurones olfactifs sensoriels	19
c. Les cellules de soutien	21
d. Les cellules à microvillosités	22
e. Les cellules engainantes	22
f. Les cellules basales	22
3. La transduction du signal olfactif	24
a. La voie canonique de l'AMPC	24
b. Autres voies de transduction du signal	25
4. Terminaison du signal olfactif	27
5. Développement de l'épithélium olfactif	28
a. Développement périnatal	28
b. Régénération de l'EO	30
6. Le système olfactif central	30
a. Le bulbe olfactif	31
b. Les structures cérébrales impliquées dans l'olfaction	32
7. Le codage des odeurs	33
8. Impact de l'état nutritionnel et de l'alimentation sur l'olfaction	35
<u>Chapître 2</u> : Les lipides	38
1. Définition	38
2. Classification des lipides	38
a. Les acides gras	40
b. Les lipides simples	41
c. Les lipides complexes	42

3. Les acides gras polyinsaturés	46
a. Synthèse des AGPI	46
b. Rôles physiologiques des AGPI	47
4. AGPI et tissus nerveux	53
a. Le système nerveux central et la rétine	53
b. La muqueuse olfactive	54
5. Les lipides de la membrane plasmique	56
a. Composition de la membrane plasmique	56
b. Les propriétés de la membrane plasmique	60
<u>Chapître 3</u> : Impact nutritionnel des AGPI n-3	65
1. Evolution de l'alimentation humaine	65
2. Recommandations nutritionnelles	66
3. Impact nutritionnel des AGPI n-3 sur les fonctions cérébrales	67
a. Observations comportementales	67
b. Mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués	73
<u>PARTIE 2 : PROBLEMATIQUE ET STRATEGIE EXPERIMENTALE</u>	79
Problématique	81
Stratégie expérimentale	83
1. Modèle nutritionnel	83
2. Etudes réalisées	85
a. La composition en acides gras du tissu olfactif périphérique (MO)	86
b. La fluidité des membranes des cils olfactifs	86
c. La neurogénèse et la maturation des NSO	86
d. Certaines fonctions cellulaires	87
e. La fonctionnalité des NSO	87
f. La perception olfactive des souris	87
<u>PARTIE 3 : RESULTATS</u>	89
<u>Etude n°1</u> : Impact des régimes maternels déséquilibrés en AGPI n-3 sur la physiologie du système olfactif périphérique de la progéniture au moment du sevrage	91
1. Impacts des régimes maternels déséquilibrés sur la composition lipidique de la muqueuse olfactive des souriceaux	93
a. Progéniture femelle : Khoury <i>et al</i> , 2020	93
b. Progéniture mâle	97
2. Impacts des régimes déséquilibrés en AGPI n-3 sur les capacités olfactives des souriceaux	103
a. Matériels et méthodes	104

b. Résultats	107
3. Impact des régimes déséquilibrés en AGPI n-3 sur la sensibilité de la muqueuse olfactive des souriceaux	110
a. Matériels et méthodes	110
b. Résultats	114
4. Impact des régimes sur l'expression des gènes dans la muqueuse olfactive des souriceaux âgés de 3 semaines	116
a. Matériels et méthodes	116
b. Résultats	120
5. Bilan des effets observés chez les souriceaux âgés de 3 semaines	122
<u>Etude n°2</u> : Impact des régimes maternels déséquilibrés en AGPI n-3 sur la physiologie du système olfactif périphérique de la progéniture à l'âge adulte	125
1. Impact des régimes maternels déséquilibrés en AGPI n-3 sur la physiologie de la MO des souris adultes (8 semaines)	127
a. Article Soubeyre <i>et al.</i> , soumis	127
b. Impact du développement sur la composition en AG de la MO de souris	131
<u>PARTIE 4 : DISCUSSION GENERALE</u>	135
<u>PARTIE 5 : CONCLUSION ET PERSPECTIVES</u>	153
<u>BIBLIOGRAPHIE</u>	157

Liste des abréviations

AA	acide arachidonique
ADP	adenosine phosphate
ACIII	adénylate cyclase III
ACE	acétophénone
AE	apport énergétique
AG	acide gras
AGMI	acide gras monoinsaturé
AGPAT	acylglycerolphosphate acyltransferase
AGPI	acide gras polyinsaturé
AGPI-LC	acide gras polyinsaturé à longue chaîne
AGS	acide gras saturé
ALA	acide alpha linoléique
AMPc	adenosine monophosphate cyclique
ANSES	agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail
ATP	adenosine triphosphate
BOA	bulbe olfactif accessoire
BG	glande de Bowman
BO	bulbe olfactif
BrdU	bromo deoxyuridine
CaCC	canal ionique sélectif des ions Cl ⁻
CamKII	calmodulin kinase II
CB	récepteur cannabinoïde
CBH	cellules basales horizontales
CBG	cellules basales globulaires
CD36	multiligand receptor cluster of differentiation 36
Cer-P-Cho	sphingomyéline
CNGC	canal cationique contrôlé par les nucléotides cycliques
CNGA2	sous unité A2 du canal CNG
CPN	cellules progénitrices neuronales
CPM	cellules progénitrices multipotentes
COX	cyclooxygénase
CYP-450	cytochrome P450

DAG	diacylglycérol
DHA	acide docosahexaénoïque
DMA	dimethyl acetals
DPA	acide docosapentaénoïque
DRM	detergent resistant membrane
eCB	endocannabinoïdes
EPA	acide eicosapentaénoïque
EPL	couche plexiforme externe
EOG	électro-olfactogramme
Esm	erreur standard à la moyenne
FFAR	free fatty acid receptor
GAP43	growth associated protein 43
GAPDH	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
Gαolf	sous unité G α de la protéine G couplée au récepteur olfactif
Gβ1	sous unité G β 1 de la protéine G couplée au récepteur olfactif
GBC	globose basal cell
GCL	couche des cellules granulaires
GDP	guanosine diphosphate
GG	ganglion de gruneberg
Gγ13	sous unité G γ 13 de la protéine G couplée au récepteur olfactif
GL	couche des glomérules
GLUT1	glucose transporter 1
GMPc	guanosine monophosphate cyclique
GPR	G protein coupled receptor
GRK3	G protein receptor kinase 3
GSL	glycerosphyngolipide
GTP	guanosine triphosphate
GBC	globose basal cell
HNF4	hepatic nuclar factor 4
HPRT	hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase
IBMX	3-isobutyl-1-methylxanthine
IL	interleukin
IP	inositol phosphate

IP3	inositol triphosphate
IPL	couche plexiforme interne
JNK	c-jun n-terminal kinase
KO	knock out
LA	acide linoléique
LOX	lipoxygenase
LPC	lysophosphatidylcholine
LPCAT	lysophosphatidylcholine acyltransferase
LPS	liposacharride
LTP	long term potentiation
LXR	liver X receptor
MCL	couche des cellules mitrales
MO	muqueuse olfactive
MOB	main olfactory bulb
MOE	main olfactory epithelium
MOR	mouse olfactory receptor
NEFA	non esterified fatty acids
NMDA	acide N-méthyl D - aspartique
NCKX4	sodium/potassium/calcium exchanger 4
Neurog1	neurogenin 1
NeuroD1	neurodiferentiation D1
NF-κB	nuclear factor kappa B
NSO	neurone sensoriel olfactif
LOX	lipoxygénase
OEC	olfactory ensheathing cell
OBP	olfactory binding protein
OlfR	olfactory receptor
ONL	couche des nerfs olfactifs
OMP	olfactory marker protein
OS	organe septal
OVN	organe voméronasal
P	phosphate
PA	phosphotidic acid

PC	phosphatidylcholine
PCR	polymerase chain reaction
PDE1C	phosphodiesterase 1C
PE	phosphatidylethanolamine
PEA	phenylethylalcohol
PG	phosphatidylglycérol
PI3K	phosphoinositide 3 kinase
PIP2	phosphatidylinositide (4,5) biphosphate
PIP3	phosphatidylinositol (3,4,5) triphosphate
PI	phosphatidylinositol
PKA	phosphokinase A
PL	phospholipide
PLA	phospholipase A
PLC	phospholipase C
Pls	plasmalogène
PNI	précurseurs neuronaux immédiats
PPAR	peroxysome proliferator –activated receptor
PS	phosphatidylserine
RCPG	récepteur couplé au protéine G
RQI	ratio quantitative index
RO	récepteur olfactif
RTP	receptor transporting protein
RXR	retinoid X receptor
S-Gal-Cer	sulfoglycosphingolipides
SGLT1	sodium glucose transporter 1
SL	sphingolipide
SLC	solute carrier
SM	sphingomyéline
SOX2	sex determining region Y box 2
SREBP-1C	sterol regulatory element binding -1C
sSA	cellules à axones courts superficiels
SUS	cellule sustentaculaire
TAAR	Trace amine-associated receptors

TNFα	tumor necrosis factor α
TUBB3	tubulin β 3 class 3
WT	wild type

Liste des illustrations

Figures

Figure 1 : Représentation schématique du système olfactif de la souris.....	18
Figure 2 : Architecture de la muqueuse olfactive.....	19
Figure 3 : Photographie d'une muqueuse olfactive humaine.....	20
Figure 4 : Organisation zonale de l'EO (A) et connexions épithélio-bulbaires (B).....	21
Figure 5 : Caractéristiques moléculaires des différents types cellulaires de la muqueuse olfactive.....	23
Figure 6 : Eléments de la cascade de transduction du signal olfactif localisés dans les cils olfactifs du neurone sensoriel olfactif.	25
Figure 7 : Modèle de régulation du signal olfactif par la voie de signalisation de la PI3K	26
Figure 8 : Schéma récapitulatif de la boucle potentielle de régulation négative dans les NSO	27
Figure 9 : Organisation du bulbe olfactif, premier relai central de l'information olfactive transmise par les neurones sensoriels olfactifs.....	32
Figure 10 : Les structures centrales de l'olfaction.....	33
Figure 11 : Modèle de codage combinatoire des molécules odorantes par les récepteurs olfactifs.....	34
Figure 12 : Localisation cellulaire des récepteurs impliqués dans la régulation de l'homéostasie énergétique au niveau de la muqueuse olfactive.....	36
Figure 13 : Schéma récapitulatif de la classification des lipides en fonction de leur structure chimique	39
Figure 14 : Formule générale d'un acide gras.	40
Figure 15 : Structure moléculaire de l'acide linoléique (LA) appartenant à la famille des AGPI n-6 et de l'acide α -linoléique (ALA) appartenant à la famille des AGPI n-3.....	41
Figure 16 : Représentation d'un glycérophospholipide.	43
Figure 17 : Représentation d'un plasmalogène	44
Figure 18 : Représentation de la sphingomyéline.	45
Figure 19 : Représentation d'un sphingoglycolipide.....	45

Figure 20 : Voies de biosynthèse des AGPI de la série n-6 et n-3	47
Figure 21 : Voies de biosynthèse des dérivés métaboliques des AGPI-LC	50
Figure 22 : Schéma récapitulatif présentant les différents mécanismes par lesquels les acides gras non estérifiés.....	52
Figure 23 : Répartition des phospholipides dans le tissu olfactif de souris et de rats	56
Figure 24 : Organisation de la membrane cellulaire.	57
Figure 25 : Asymétrie membranaire.....	60
Figure 26 : Organisation de la membrane plasmique d'une cellule animale.	61
Figure 27 : Mouvements possibles des lipides dans la bicouche.	63
Figure 28 : Evènements impliqués dans la réponse inflammatoire et sa résolution.....	76
Figure 29 : Protocole expérimental mis en œuvre.....	85
Figure 30 : Enregistrement de l'activité respiratoire des souris en réponse à des stimulations odorantes à l'aide d'un pléthysmographe.....	104
Figure 31 : Etapes de traitement des signaux obtenus par pléthysmographie.....	106
Figure 32 : Index de flairage des souris F1 mâles âgées de 3 semaines, stimulées par le phényléthyl alcool	108
Figure 33 : Système d'enregistrement d'électro-olfactogrammes (EOG).....	110
Figure 34 : Structures du phényléthylalcool (PEA) et de l'acétophénone (ACE).....	112
Figure 35 : Schéma présentant les paramètres extraits des enregistrements d'EOG.	113
Figure 36 : Données obtenues par EOG chez les souris F1 ♂ âgées de 3 semaines.	115
Figure 37 : Procédure de prélèvement du tissu olfactif périphérique.....	117
Figure 38 : Expression génique au sein de la MO des souriceaux.....	120

Tableaux

Tableau 1 : Distribution des classes de lipides dans la muqueuse olfactive de souris et de rats.....	54
Tableau 2 : Composition en acides gras de la muqueuse olfactive de souris et de rats.....	55
Tableau 3 : Besoins physiologiques minimaux en AG totaux et en AGPI indispensables chez l'Homme adulte.....	66
Tableau 4 : Sources de lipides utilisées dans les régimes expérimentaux.....	83
Tableau 5 : Composition en AG des régimes.....	84
Tableau 6 : Profil des acides gras de la muqueuse olfactive de souriceaux mâles âgés de 3 semaines.....	99
Tableau 7 : Profil des acides gras de la muqueuse olfactive de souriceaux femelles et mâles âgés de 3 semaines, nés de mères sous régimes.....	101
Tableau 8 : Liste des gènes de référence et d'intérêt quantifiés par Q-PCR.....	118
Tableau 9 : Profil des acides gras de la muqueuse olfactive de souris mâles âgées de 3 et 8 semaines.....	133

Préambule

Nos sens nous permettent d'être en contact direct avec notre environnement et d'appréhender le monde qui nous entoure. L'olfaction est le sens qui permet de percevoir les odeurs. Cette modalité sensorielle joue un rôle majeur dans la détection des signaux chimiques volatils présents dans l'environnement et déclenche des comportements tels que la prise alimentaire, les interactions sociales ou l'évitement d'un danger.

L'olfaction est un sens complexe qui, de manière consciente ou inconsciente, permet de détecter et discriminer de multiples odeurs. Ces odeurs peuvent être plaisantes, et par expérience nous « régaler d'avance », ou au contraire aversives et déclencher de ce fait un comportement de retrait. Ce sens puissant module nos comportements, notre cognition et nos humeurs, en participant notamment à la construction de souvenirs ou encore à l'émergence d'émotions.

L'olfaction a longtemps été un sens décrié. Jugée trop animale et gênante pour l'Homme, cette modalité sensorielle a suscité peu d'intérêt par les scientifiques contrairement à d'autres sens comme la vision.

Cependant les travaux de Buck et Axel sur les récepteurs olfactifs publiés en 1991 (Buck & Axel, 1991), puis récompensés par le prix Nobel de physiologie et de médecine en 2004, marquent un tournant dans la recherche expérimentale. Dès lors, on assiste à une croissance exponentielle la recherche dans le domaine de l'olfaction que ce soit dans le secteur académique ou privé.

Ces travaux ont permis de caractériser les gènes codant pour des récepteurs olfactifs : 400 gènes fonctionnels ont été identifiés chez l'Homme et environ 1300 chez la souris. Si la différence paraît importante, l'Homme n'en est pas moins un « mauvais senteur ». Plusieurs études suggèrent que les capacités cognitives humaines compensent ce répertoire restreint.

Les recherches menées depuis une dizaine d'années ont également démontré que les statuts nutritionnel et métabolique des individus peuvent avoir une influence sur leurs capacités olfactives. Des dysfonctionnements du système olfactif ont ainsi été observés chez des personnes atteintes de pathologies multifactorielles comme l'obésité ou le diabète.

Ces pathologies chroniques peuvent en partie résulter de la surconsommation d'aliments riches en gras et/ou en sucre. Bien qu'indispensables comme source d'énergie, les lipides sont souvent présents de manière excédentaire dans l'alimentation moderne. Des apports déséquilibrés en acides gras pourraient contribuer à augmenter les risques d'obésité, de diabète, et d'autres maladies chroniques.

Les acides gras polyinsaturés (AGPI) de la série n-6 et de la série n-3 sont des composés lipidiques impliqués dans de nombreuses fonctions biologiques, en particulier au niveau du système nerveux. Chez l'Homme, l'acide linoléique (série n-6) et l'acide alpha linoléique (série n-3) sont des AGPI dits essentiels et doivent être apportés par l'alimentation. Pour assurer un apport alimentaire adéquat de certains AGPI tout en limitant leurs effets délétères sur la santé, l'agence nationale de la sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (ANSES) recommande de consommer un AGPI de la série n-3 pour 4 AGPI de la série n-6.

C'est sur la base de cette recommandation que s'inscrit mon projet de thèse. De nombreuses études ont démontré l'importance des AGPI n-3 dans le développement et le fonctionnement de tissus nerveux comme le cerveau et la rétine. Cependant, le rôle des AGPI dans le développement et le fonctionnement du système olfactif reste peu exploré. Ainsi, l'objectif de cette thèse est de caractériser l'impact de régimes déséquilibrés en AGPI de la série n-3 sur la physiologie du système olfactif périphérique chez la souris.

La section introductive de ce manuscrit (Partie 1) est organisée en trois chapitres. Le premier chapitre décrit l'organisation anatomique et fonctionnelle du système olfactif chez la souris. Le système périphérique est présenté de manière plus approfondie car nous avons focalisé nos études sur ce tissu. Le deuxième chapitre porte sur la classification et les diverses fonctions biologiques des lipides. Le troisième chapitre résume les connaissances concernant l'impact nutritionnel des AGPI n-3 au cours de la période périnatale et postnatale sur les fonctions cérébrales.

La problématique et la stratégie expérimentale mise en œuvre dans le cadre de ce projet de thèse sont ensuite exposées dans une section spécifique (Partie 2).

Après la présentation des résultats obtenus, majoritairement sous forme de publications ou de manuscrits (Partie 3), ces derniers font l'objet d'une discussion générale (Partie 4).

Ce manuscrit s'achève sur une conclusion incluant les perspectives possibles de ce travail (Partie 5).

PARTIE 1

Introduction

CHAPITRE 1 : Le système olfactif chez le rongeur

Le système olfactif de mammifère est un système complexe regroupant à la fois des structures appartenant au système nerveux périphérique et au système nerveux central. Ces différentes structures sont connectées entre elles et permettent en premier lieu la détection et la transduction du signal olfactif au niveau périphérique puis son intégration et son traitement au niveau central. L'organisation et le fonctionnement du système olfactif humain présentent de nombreuses similitudes avec le système olfactif des rongeurs.

1. Le système olfactif périphérique de la souris

Chez le rongeur, le système olfactif périphérique est localisé au fond des cavités nasales (***Figure 1***) (Brennan & Zufall, 2006). Il est composé d'un système principal constitué de la muqueuse olfactive (MO) chargée de détecter les molécules odorantes présentes dans l'air inspiré et de systèmes accessoires composés de l'organe septal (OS), les ganglions de Grueneberg (GG) et de l'organe voméronasal (OVN). Ces différents éléments sont localisés le long du septum nasal et permettent de détecter certains types de molécules odorantes volatiles notamment les phéromones (Rodriguez, 2004).

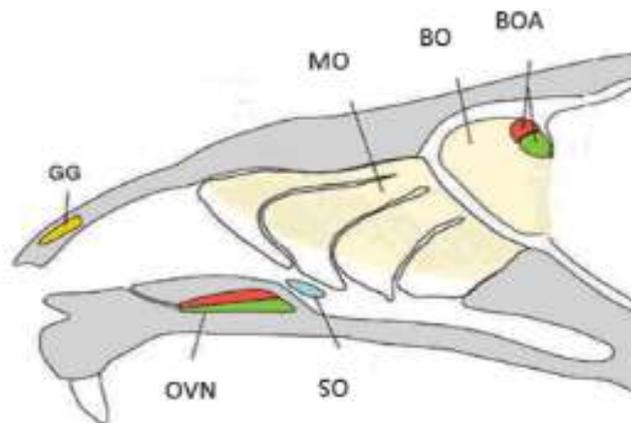


Figure 1 : Représentation schématique du système olfactif de la souris. Ce système est composé de plusieurs organes : la muqueuse olfactive (MO), l'organe voméronasal (OVN), l'organe septal (OS) et le ganglion de Grueneberg (GG). Le bulbe olfactif comprend le bulbe olfactif principal (BO) et accessoire (BOA). D'après Brennan & Zufall, 2006.

2. Anatomie de la muqueuse olfactive de souris

Au sein des fosses nasales, la MO est répartie sur le septum et sur des structures cartilagineuses appelées cornets. Elle est constituée d'un neuro-épithélium pseudostratifié appelé épithélium olfactif (EO) et d'une lamina propria. L'EO se compose de plusieurs types cellulaires et est recouvert de mucus (**Figure 2**) ((Palouzier-Paulignan *et al.*, 2012).

a. Le mucus

Le mucus est sécrété par les glandes de Bowman situées dans la lame basale de la MO. C'est un liquide aqueux à travers lequel les odorants volatils et le plus souvent hydrophobes, doivent diffuser pour atteindre les neurones olfactifs. Le mucus contient des petites protéines hydrophiles appelées « olfactory binding protein » (OBP) capables de se lier de manière réversible aux odorants. Ces protéines joueraient un rôle dans le transport et la dégradation des odorants présents dans le mucus (Heydel *et al.*, 2013).

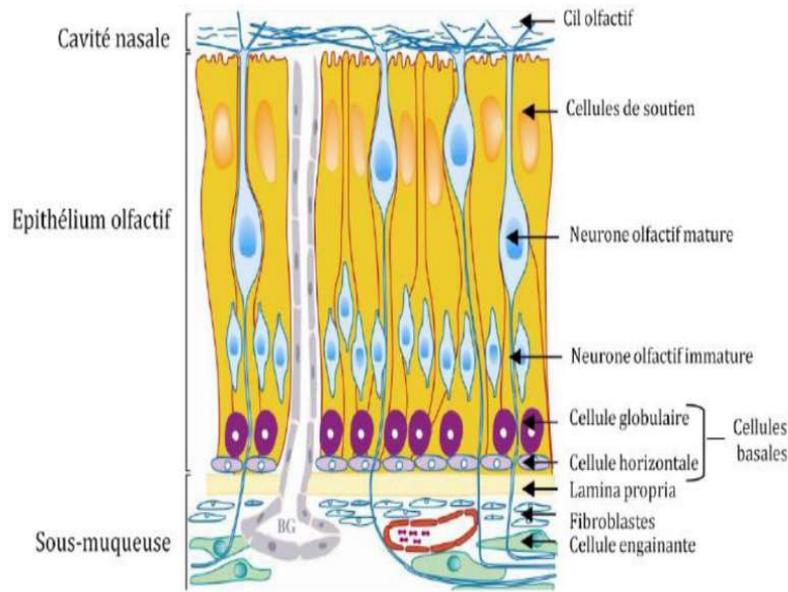


Figure 2 : Architecture de la muqueuse olfactive. La MO se compose d'un neuro-épithélium pseudo-stratifié reposant sur une lamina propria. Cet épithélium est composé de neurones olfactifs intercalés entre des cellules de soutien. Il se renouvelle grâce à la prolifération et la différenciation des cellules basales. BG : glande de Bowman. D'après Palouzier-Paulignan et *al.*, 2012.

b. Les neurones sensoriels olfactifs (NSO)

Les neurones sensoriels olfactifs (NSO) jouent un rôle essentiel de la détection des molécules odorantes (**Figure 3**) (Morrison & Costanzo, 1990). Ils tapissent l'ensemble de l'EO, c'est-à-dire le septum et les cornets. Ce sont des neurones bipolaires qui projettent du côté apical de l'EO, une dendrite se terminant par un renflement appelé bouton dendritique et du côté basal un axone qui, en traversant la lame criblée et l'os ethmoïde, se projette vers les bulbes olfactifs (Menini, 2010).

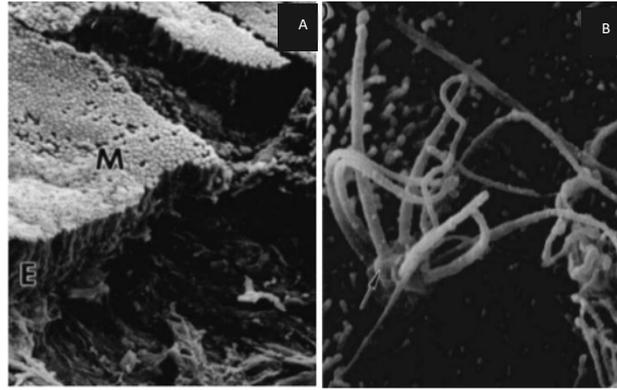


Figure 3 : Photographie d'une muqueuse olfactive humaine; A : Vue tri-dimensionnelle de l'épithélium olfactif (E) et du mucus (M) . B. Vue tri-dimensionnelle d'un bouton dendritique donnant naissance à de multiples cils olfactifs humain. D'après Morrison & Costanzo, 1990.

Le bouton dendritique est recouvert de cils olfactifs baignant dans le mucus de la cavité nasale. En recouvrant l'EO, les cils olfactifs forment un réseau dense facilitant la détection olfactive. La longueur des cils dépend de la localisation des NSO au sein de l'épithélium. Les NSO possédant les plus longs cils sont situés dans les régions fortement exposées au flux d'air. A l'inverse les NSO possédant les cils les plus courts sont situés dans les zones moins soumises au flux d'air, et atteintes seulement par des odorants présents à de très fortes concentrations dans la cavité nasale (Challis *et al.*, 2015).

Les cils olfactifs jouent un rôle essentiel dans la transduction du signal olfactif car ils concentrent l'ensemble des acteurs de la cascade de transduction et en particulier les récepteurs olfactifs (RO) permettant de détecter les molécules odorantes (Firestein, 2001).

Les NSO ont la particularité d'exprimer un seul RO fonctionnel (Buck, 1996; Imai & Sakano, 2008). Le choix de l'expression du RO a lieu précocement au cours de la neurogenèse et dépend de la localisation du NSO dans la muqueuse olfactive (Takeuchi *et al.*, 2010). Lorsque le RO est fonctionnel, la protéine produite exerce un rétro contrôle pour bloquer l'expression de gènes codant pour d'autres RO afin de maintenir le pool du RO exprimé.

Les NSO sont distribués dans l'une des quatre zones décrites selon les axes dorso-ventral ou median-latéral de la cavité nasale (**Figure 4**) (Mori *et al.*, 2006; Lodovichi, 2021). Au l'intérieur

de ces zones, les neurones exprimant le même RO forment des clusters et sont répartis aléatoirement parmi d'autres neurones porteurs d'autres récepteurs, formant ainsi une mosaïque fonctionnelle (Ma & Shepherd, 2000). Cette distribution permet également aux axones des NSO exprimant le même RO de se projeter de manière spécifique vers un ou deux glomérules dans les bulbes olfactifs (**Figure 4**). De plus, si l'expression d'un RO par le NSO détermine le guidage axonal vers un glomérule cible (Mombaerts, 1996; Wang *et al.*, 1998), il existe également une corrélation entre le nombre de NSO exprimant un RO donné et la taille du glomérule correspondant dans le bulbe olfactif (Bressel *et al.*, 2016).

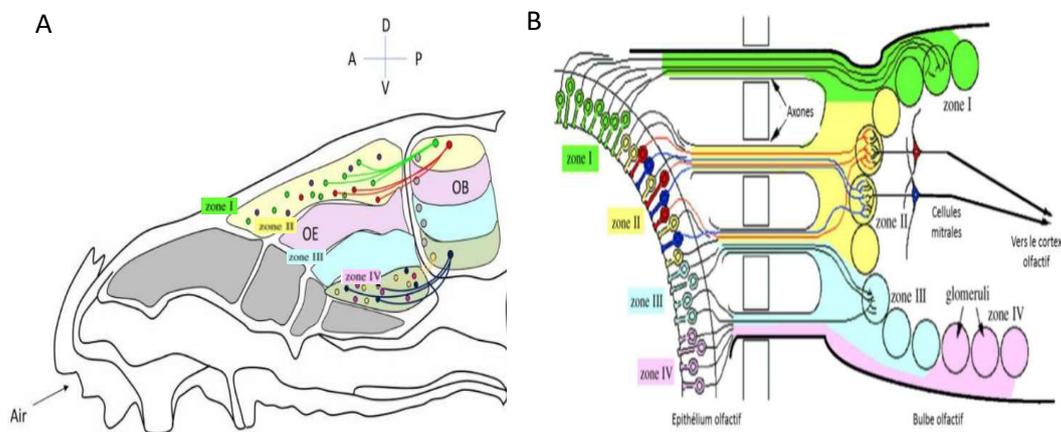


Figure 4 : Organisation zonale de l'EO (A) et connexions épithélio-bulbaires (B). Les NSO sont répartis au sein de l'EO en fonction du type de RO qu'ils expriment. Tous les NSO exprimant un RO donné projettent leurs axones vers le même glomérule dans le bulbe olfactif. D'après Mori *et al.*, 2006 et Lodovichi, 2021.

c. Les cellules de soutien

Les cellules de soutien ou cellules sustentaculaires sont des cellules possédant sur leur surface apicale des microvillosités qui baignent dans le mucus. On les retrouve de part et d'autre des NSO. Elles assurent la cohésion cellulaire de l'EO grâce à la présence de jonctions serrées au niveau basal. Ces cellules jouent également un rôle dans la détoxification et l'élimination des

substances exogènes potentiellement nocives grâce à l'expression d'enzymes du métabolisme des xénobiotiques. Elles pourraient aussi jouer un rôle dans la clairance des molécules odorantes présentes dans l'espace péri-récepteur afin de préserver la sensibilité des NSO (Heydel *et al.*, 2010).

d. Les cellules à microvillosités

Ces cellules, dont le corps cellulaire se situe dans la couche superficielle de l'EO, ne projettent pas d'axones vers le bulbe olfactif mais sont capables de détecter les odorants (Hegg *et al.*, 2010). Leur rôle n'est pas connu à ce jour bien que des éléments de la cascade de transduction de l'inositol triphosphate (IP3) soient présents dans certaines cellules à microvillosités (Genovese & Tizzano, 2018).

e. Les cellules engainantes

Les cellules engainantes sont des cellules gliales périphériques semblables aux cellules gliales du système nerveux central. Elles entourent les axones des NSO depuis leur base, à la sortie de l'épithélium olfactif, jusqu'aux bulbes olfactifs. Les cellules n'entourent pas les axones individuellement mais par groupe de 50 à 200 axones (Doucette, 1993). Elles joueraient un rôle dans la médiation de la survie neuronale et dans la croissance et la régénération des axones des NSO (Ramón-Cueto & Avila, 1998).

f. Les cellules basales

Les cellules basales constituent l'ensemble des cellules souches multipotentes de l'EO et jouent un rôle crucial dans la neurogénèse tout au cours de la vie (**Figure 5**). Ces cellules sont réparties en deux groupes : les cellules globulaires situées sous la couche neuronale et les cellules horizontales au contact direct de la lame basale (**Figure 5A**) (Mackay-Sim & Kittel, 1991). Les

cellules horizontales se divisent en moyenne tous les soixante jours et constituent le pool des cellules souches de l'EO. Il a été montré que suite à un traumatisme, les cellules horizontales peuvent restaurer les différents types cellulaires présents dans l'EO (Glezer & Malnic, 2019).

Les cellules globulaires sont quant à elles des cellules ayant une activité mitotique. Elles ont la capacité de donner naissance à l'ensemble des cellules de l'EO à l'exception des macrophages et des cellules microgliales. Sous l'expression de certains marqueurs moléculaires, les cellules globulaires peuvent se différencier en trois sous-populations: les cellules progénitrices multipotentes (CPM), les cellules progénitrices neuronales (CPN) et les précurseurs neuronaux intermédiaires (PNI) (**Figure 5B**) (Borgmann-Winter *et al.*, 2015; Schwob *et al.*, 2017). Les cellules globulaires se renouvellent tout au long de la vie et maintiennent ainsi le pool de NSO au sein de l'EO (Glezer & Malnic, 2019).

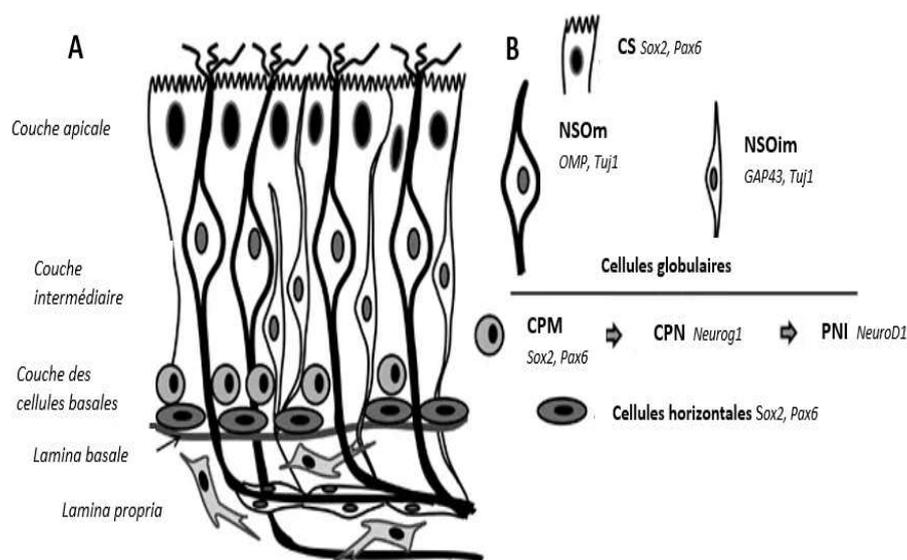


Figure 5 : Caractéristiques moléculaires des différents types cellulaires de la muqueuse olfactive. Adapté Borgmann-Winter *et al.*, 2015. **A** : Organisation cellulaire de la MO. **B** : Marqueurs moléculaires qui peuvent différencier les différents types cellulaires présents dans la MO : cellules de soutien (CS), NSO immatures (NSOim), NSO matures (NSOm), cellules globulaires (cellules progénitrices multipotentes (CPM), cellules progénitrices neuronales (CPN), précurseurs neuronaux immédiats (PNI), et cellules horizontales.

3. La transduction du signal olfactif

La transduction du signal olfactif a lieu au niveau des cils olfactifs des NSO. Elle regroupe à la fois un ensemble d'étapes biochimiques avec la production de seconds messagers et des étapes électriques avec l'ouverture des canaux ioniques. Ces mécanismes finement régulés se déclenchent dès la liaison de l'odorant à son récepteur. L'ouverture successive des canaux ioniques va modifier le potentiel de membrane, appelé potentiel récepteur. Cette modification va moduler l'émission des potentiels d'action qui sont transmis le long de l'axone jusqu'au bulbe olfactif.

Les RO sont des récepteurs couplés aux protéines G. Ce sont des protéines composées de 7 domaines transmembranaires. La composition en acides aminés de la poche de liaison aux odorants, située principalement entre les domaines transmembranaires 3 à 7, est hypervariable et permet de reconnaître un nombre considérable d'odorants différents en terme de structure et de taille (Katada *et al.*, 2005). Chez la souris, les RO sont codés par plus de 1000 gènes localisés sur la quasi-totalité des chromosomes (Buck & Axel, 1991; Zhang & Firestein, 2002).

Des récepteurs capables de détecter des odorants ayant une fonction amine ont également été identifiés dans la MO. On les appelle les Trace Amine - associated receptors (TAARs). Ce sont des récepteurs localisés dans les cils d'une sous population de NSO. Ils sont impliqués dans la détection des prédateurs ou d'animaux morts (Fleischer *et al.*, 2009).

Plusieurs voies de transduction du signal de transduction ont été décrites :

a. La voie canonique de l'AMPC

Les RO sont majoritairement couplés à une protéine G spécifique appelée Golf. Cette protéine G est composée de 3 sous-unités : α_{olf} , β_1 et γ_{13} . Quand l'odorant se fixe à un RO, la sous unité $G_{\alpha_{olf}}$ activée convertit le GDP en GTP (**Figure 6**) (Kaupp, 2010). Le GTP active à son tour l'adénylate cyclase III (ACIII) qui transforme l'ATP intracellulaire en AMPc. L'augmentation de la teneur en AMPc intra-ciliaire induit l'ouverture des canaux cationiques sensibles

aux nucléotides cycliques (CNGC) et l'entrée des ions Na^+ et Ca^{2+} , créant ainsi un courant entrant qui dépolarise le neurone (Kurahashi, 1989). Si l'accumulation de Ca^{2+} est suffisante, les canaux chlore activés par le Ca^{2+} (CaCC) s'ouvrent et provoquent la sortie d'ions Cl^- ; cela entraîne une deuxième dépolarisation qui conduit à la production de plusieurs potentiels d'action qui se propagent le long de l'axone jusqu'au bulbe olfactif, première structure centrale impliquée dans le traitement de l'information olfactive (Schild & Restrepo, 1998; Firestein, 2001; Kleene, 2008).

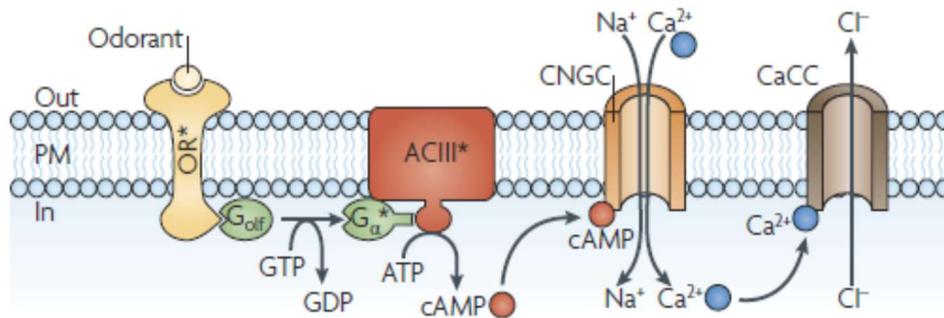


Figure 6 : Eléments de la cascade de transduction du signal olfactif localisés dans les cils olfactifs du neurone sensoriel olfactif. D'après Kaupp, 2010.

b. Autres voies de transduction du signal

Outre la voie canonique de l'AMPC, d'autres voies de transduction ont été décrites dans les NSO. Les plus citées sont la voie de la guanosine monophosphate cyclique (GMPc) qui serait (Kleene, 2008) impliquée dans la détection des gaz (monoxyde d'azote et de carbone) et la voie de l'inositol triphosphate (IP3) (Kleene, 2008).

La voie de l'IP3 est la voie principale de la transduction olfactive chez les invertébrés et de ce fait est la voie alternative la plus étudiée (Ache & Young, 2005). Les phosphoinositides sont des dérivés phosphorylés d'une classe particulière de phospholipides, les phosphatidylinositols.

Suite à l'activation des RO dans certains NSO deux enzymes peuvent être activées : la phospholipase C (PLC) qui va cliver le phosphatidylinositol (4,5) biphosphate (PIP2) membranaire

pour produire du diacylglycerol (DAG) et l'IP3 et la phosphoinositol-3-kinase (PI3K) qui va phosphoryler le PIP2 en phosphatidyl-(3,4,5)-triphosphate (PIP3)) (**Figure 7**) (Ache, 2010).

En se liant à son récepteur présent au niveau de la membrane des cils olfactifs, l'IP3 peut induire l'entrée de calcium dans les NSO et participer à la transduction du signal olfactif (Cunningham *et al.*, 1993; Bobkov & Ache, 2005).

Le PIP3 quant à lui agit comme un second messenger. Il est connu pour être impliqué dans divers mécanismes cellulaires cruciaux comme la prolifération, le trafic ou encore l'apoptose cellulaire. Une étude menée chez le rat par Zhainazarov et al a démontré que PIP3 est capable d'inhiber l'activation des canaux CNGC en diminuant la sensibilité des NSO à l'AMPC (Zhainazarov *et al.*, 2004). Ce phénomène d'inhibition du signal olfactif impliquerait également l'enzyme PI3K (Ukhanov *et al.*, 2013, 2016).

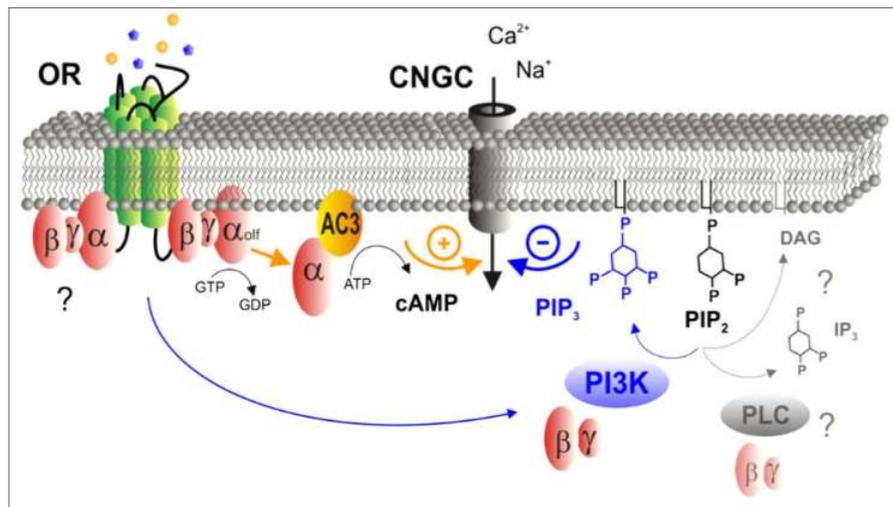


Figure 7 : Modèle de régulation du signal olfactif par la voie de signalisation de la PI3K proposé par Ache, 2010. Un des odorants du mélange (en jaune) active la voie canonique de l'AMPC. L'autre odorant du mélange (en bleu) se fixerait sur le même RO mais inhiberait la cascade de signalisation classique en activant la voie de la PI3K via une des sous-unités β ou γ de la protéine G. L'activation de la PI3K entrainerait la production de PIP3 qui inhiberait les canaux CNGC et l'entrée du Ca^{2+} .

4. Terminaison du signal olfactif

A ce jour, différents mécanismes de terminaison du signal olfactif périphérique ont été proposés (**Figure 8**) (Kato & Touhara, 2009).

Le premier mécanisme implique les OBP présentes dans le mucus. Suite à une stimulation odorante, ces protéines neutraliseraient les odorants en favorisant leur internalisation dans les cellules de soutien (Heydel et al., 2010; Strotmann & Breer, 2011) .

Au niveau des NSO (**Figure 8**), les RO pourraient également être inactivés par phosphorylation de la protéine kinase 3 liée aux protéines G (GRK3) ou la PKA (Kato & Touhara, 2009).

Enfin le signal olfactif cesse quand le taux de Ca^{2+} ou d'AMPc intracellulaire revient à la normale. Le niveau de Ca^{2+} peut être abaissé soit par l'intervention de l'échangeur $\text{Ca}^{2+}/\text{Na}^+$ (NCKX4) au niveau ciliaire soit par la formation du complexe inhibiteur Ca^{2+} /Calmoduline (Stephan *et al.*, 2011).

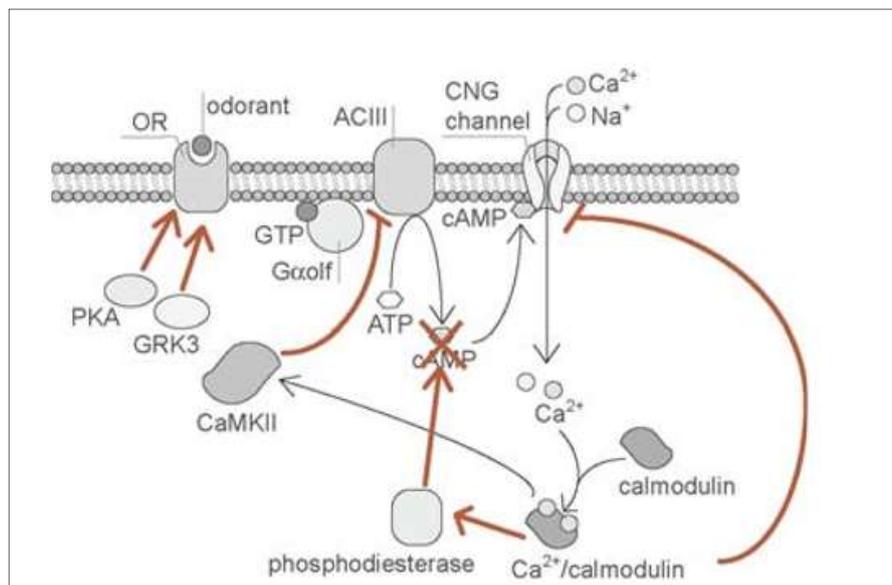


Figure 8 : Schéma récapitulatif de la boucle potentielle de régulation négative dans les NSO. L'augmentation de calcium intracellulaire provoque la formation du complexe Ca^{2+} /calmoduline qui va directement se lier et bloquer les canaux CNG (1). Ce complexe peut également activer la PDE1C qui dégrade l'AMPc (2) ou activer la CaMKII qui inhibe ACIII (3). Enfin les RO peuvent être inactivés après phosphorylation par la GRK3 ou la PKA (4). D'après Kato & Touhara, 2009.

Lorsque le Ca^{2+} intracellulaire se lie à la calmoduline, le complexe ainsi formé peut intervenir à différents niveaux. Il peut (i) se lier aux canaux CNG et provoquer leur fermeture, empêchant toute nouvelle entrée de Ca^{2+} , (ii) activer la phosphodiesterase 1C (PDE1C) qui a pour fonction de dégrader l'AMPc, (iii) activer la calmoduline kinase II (CamKII) qui inhibera l'ACIII empêchant toute nouvelle synthèse d'AMPc (Kato & Touhara, 2009).

Enfin (iv) la transduction du signal se termine lorsque les RO phosphorylés par la GRK3 ou la PKA se lient aux arrestines- β 2 recrutées à la membrane. Cette liaison empêche toute nouvelle activation du RO en facilitant son internalisation par l'intermédiaire des clathrines (Menco, 2005).

Ainsi, au niveau périphérique, l'encodage des signaux olfactifs peut être régulé par le niveau de calcium intracellulaire. La concentration intra ciliaire du Ca^{2+} joue un rôle crucial à la fois dans l'activation et la terminaison du signal olfactif. Le Ca^{2+} est à la fois impliqué dans la transduction, la régulation et l'adaptation du signal olfactif dans les NSO (Stephan *et al.*, 2011).

5. Développement de l'épithélium olfactif

a. Développement périnatal

Chez la souris, la morphogénèse du système olfactif périphérique peut se résumer en cinq étapes clés. Entre le premier jour de la vie embryonnaire (E1) et le dixième jour (E10), on assiste à la formation de la placode olfactive et des cavités nasales. A partir de E11, la genèse axonale marque la première étape de différenciation des NSO. A E12, on observe la formation des premières dendrites conférant aux NSO leur forme bipolaire. Entre E12 et E18, les NSO poursuivent leur différenciation et leur maturation en particulier au niveau des cils. Enfin, après E18, les cellules de soutien et des glandes de Bowman atteignent leur stade final de différenciation et de maturation (Brunjes & Frazier, 1986).

A la naissance, l'EO est en partie immature et va continuer de se développer au cours du premier mois de vie. Plusieurs études ont permis de mettre en évidence la séquence des événements moléculaires indispensables pour la formation d'un système olfactif périphérique performant

au cours du développement. Au fur et à mesure de leur maturation, les NSO gagnent la partie apicale de l'EO et expriment certaines protéines comme ACIII et l'olfactory marker protein (OMP) dont on sait qu'elles jouent un rôle capital dans la mise en place des connexions épithélio-bulbaires.

L'OMP est une protéine exprimée dans les neurones olfactifs matures (Nickell *et al.*, 2012). Elle est détectée dès la vie embryonnaire (E14) pour atteindre son niveau maximal 30 jours après la naissance. Le rôle de l'OMP est encore discuté mais plusieurs études suggèrent qu'en plus de son implication dans la maturation des NSO, cette protéine interagirait avec différents acteurs de la cascade de transduction du signal olfactif impliqués dans la terminaison du signal, en particulier ACIII et l'échangeur Ca^{2+}/Na^{+} (Kwon *et al.*, 2009; Lee *et al.*, 2011; Stephan *et al.*, 2011).

Très récemment, une étude menée par Nakashima et al a démontré qu'OMP possède deux sites de liaison potentiels à l'AMPC au sein de sa séquence d'acides aminés et propose un nouveau rôle pour la protéine (Nakashima *et al.*, 2020). En effet, lorsque l'odorant se lie à son récepteur, l'augmentation intracellulaire d'AMPC provoque l'influx de calcium responsable de l'ouverture des canaux CNG et de la dépolarisation initiale des NSO. Dans cette étude, les auteurs suggèrent qu'OMP a la capacité de tamponner la production d'AMPC au niveau des cils olfactifs. Ces résultats renforcent le concept selon lequel OMP, en plus d'être le marqueur des NSO matures, participe activement à la terminaison du signal olfactif (Dibattista *et al.*, 2021).

Rodriguez et al ont étudié l'expression de différentes protéines durant la période critique du développement (Rodriguez-Gil *et al.*, 2015). Leurs travaux, basés sur des injections de BrdU+ dans les cellules basales de l'EO, montrent que le taux de migration des NSO vers la partie apicale du tissu est en moyenne de 3 à 5 % par jour. Grâce à ce modèle, ils confirment que les RO sont détectés 4 jours après l'injection, tandis que ACIII et OMP sont respectivement repérés 5 et 6 jours après. In utéro, la séquence est similaire : les RO sont détectés au plus tôt à E11.25 suivi par l'OMP à E14 (Mori, 2014). Le fait qu'ACIII soit détectée après l'expression des RO mais avant celle de l'OMP est crucial et confirme les rôles déterminants des RO et de l'ACIII dans la mise en place des projections axonales en direction des BO.

b. Régénération de l'EO

Du fait de leur localisation, les NSO peuvent être soumis à de nombreuses agressions extérieures. Ces agressions qu'elles soient chimiques ou infectieuses peuvent altérer les tissus olfactifs en provoquant la mort des différents types cellulaires constituant l'épithélium olfactif. Pour faire face à ces agressions, le système olfactif périphérique a la particularité de se renouveler tout au long de la vie.

La régénération du système olfactif périphérique a été particulièrement étudiée soit après une exposition à un agent toxique détruisant les cellules composant l'épithélium olfactif soit après la section du nerf olfactif. Ces deux techniques ont permis de démontrer que les différents types cellulaires de l'épithélium olfactif se renouvellent grâce à la présence des cellules basales et que la durée de vie moyenne des NSO se situe entre 30 et 90 jours (Mackay-Sim & Kittel, 1991).

D'autres études réalisées chez le rat ont confirmé que les NSO se renouvellent entre 6 à 8 semaines après une exposition au bromure d'éthyle et que le pattern d'expression des RO est conservé après régénération de l'épithélium olfactif (Schwob *et al.*, 1995). Plus récemment, Schwob *et al.* ont montré que les connections épithélio-glomérulaires sont également restaurées 8 semaines après une lésion. Cependant, les projections axonales restaurées ne sont pas complètement analogues à celles existantes avant la lésion. En effet, les axones nouvellement générés, en plus de se projeter vers les glomérules cibles, établissent aussi des connexions vers d'autres glomérules (Schwob, 2005).

6. Le système olfactif central

Le système olfactif central regroupe le bulbe olfactif, premier relai de l'information olfactive dans le cerveau, et les autres structures cérébrales impliquées dans le traitement du message olfactif provenant de l'EO principal. L'information olfactive transmise le long des axones des NSO est transmise vers les structures cérébrales via les neurones - relais du BO.

a. Le bulbe olfactif

Le bulbe olfactif (BO) est organisé en plusieurs couches de cellules responsables de la transmission et de l'intégration du signal olfactif (**Figure 9**) (Nagayama *et al.*, 2014).

De l'extérieur vers l'intérieur, on trouve la couche des nerfs olfactifs (ONL) suivie de la couche contenant les glomérules (GL). Ce sont des microstructures sphériques où les axones des NSO forment les premières synapses axo-dendritiques avec des cellules mitrales et des cellules à panaches aussi appelés « neurones – relais ». Ces synapses constituent le 1er relai de l'intégration du signal olfactif. D'autres neurones, les cellules péri-glomérulaires (PG) et les cellules à axones courts superficiels (sSA Cells) connectent les glomérules entre eux et modulent l'information olfactive. En effet, les PG peuvent former des synapses excitatrices axo-dendritiques avec les NSO et des synapses axo-dendritiques et dendro-dendritiques avec les neurones-relais. Grâce à ces connexions synaptiques, les PG peuvent à la fois exercer un rétro-contrôle sur les OSN mais aussi sur les neurones relais (Zou *et al.*, 2009; Nagayama *et al.*, 2014).

La couche plexiforme externe (EPL) est composée de cellules à panaches qui projettent leurs axones vers des régions spécifiques du cortex olfactif. Il existe dans cette couche un véritable « réseau » de dendrites issus des cellules mitrales et des cellules à panaches sur lesquelles les dendrites des cellules granulaires viennent former des synapses inhibitrices pour réguler le message olfactif. Il y a ensuite la couche des cellules mitrales (MCL) qui projettent leurs axones vers différentes régions du cortex olfactif, en particulier vers le noyau olfactif antérieur et le cortex piriforme. Enfin on trouve la couche des cellules granulaires (GCL) qui sont des interneurons capables de former des synapses dendro-dendritiques inhibitrices avec les cellules mitrales et les cellules à panache.

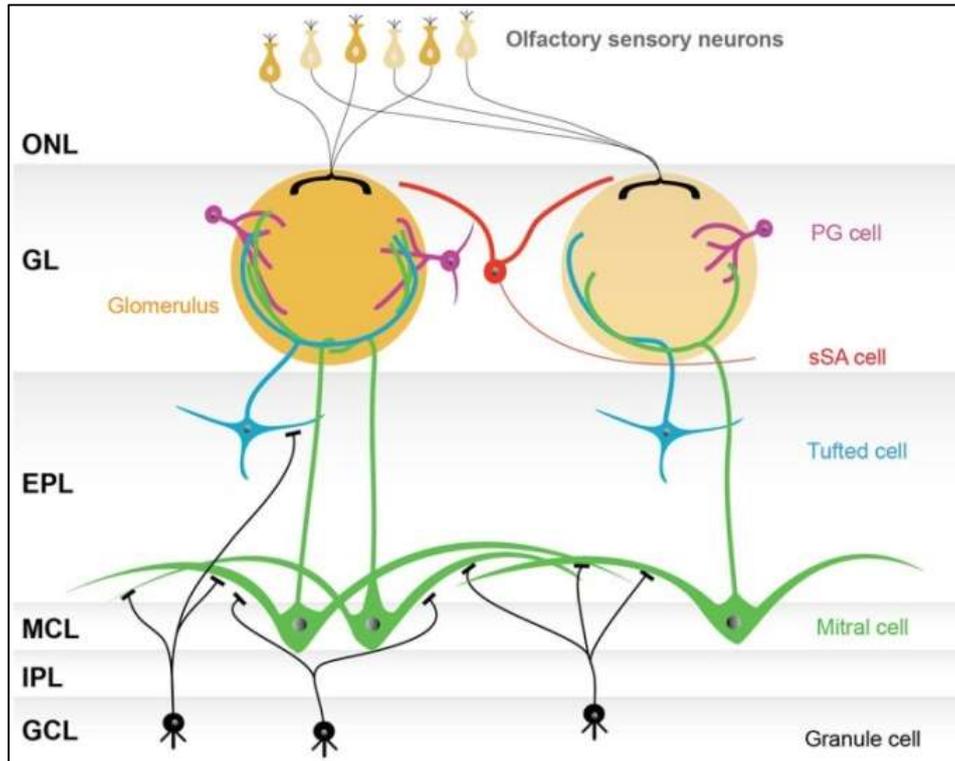


Figure 9 : Organisation du bulbe olfactif, premier relai central de l'information olfactive transmise par les neurones sensoriels olfactifs. ONL : couche de nerfs olfactifs, GL : couche glomérulaire, EPL : couche plexiforme externe, MCL : couche des cellules mitrales, IPL : couche plexiforme interne, GCL : couche granulaire, Tufted cells : cellules à panache. D'après Nagayama *et al.*, 2014.

b. Les structures cérébrales impliquées dans l'olfaction

Deux principales voies d'innervation ont été décrites (**Figure 10**) (Imai, 2014) :

- La voie latérale qui concerne les axones se projetant directement vers le cortex olfactif. Chez le rongeur, le cortex olfactif regroupe le noyau olfactif antérieur, le cortex piriforme, le cortex péri-amygdalien, le cortex entorhinal latéral et le tubercule olfactif. Les projections sont ensuite envoyées vers l'amygdale, le thalamus, l'hypothalamus ou l'hippocampe.

- La voie médiane qui concerne les axones se projetant vers le noyau olfactif antérieur. Les projections s'orientent ensuite vers le cortex piriforme, le tubercule olfactif et l'hypothalamus.

En retour, les BO reçoivent de nombreuses afférences inhibitrices en provenance de ces structures cérébrales, ce qui permet ainsi un rétro-contrôle subtil de l'information olfactive.

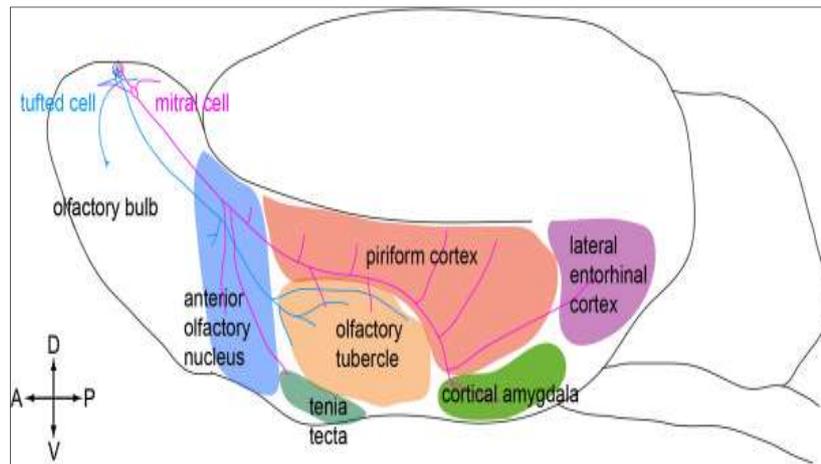


Figure 10 : Les structures centrales de l'olfaction. Circuit des projections axonales des cellules mitrales (en rose) et des cellules à panaches (en bleu) du bulbe olfactif vers les différentes structures cérébrales chez la souris. D'après Imai, 2014.

7. Le codage des odeurs

La perception d'une odeur est le résultat final du codage de l'information olfactive. Cette information est traitée à plusieurs niveaux, tout d'abord au niveau périphérique puis au niveau central.

La première étape du codage des odeurs a lieu au sein de l'épithélium olfactif. Les molécules odorantes volatiles sont détectées par les RO exprimés dans les NSO. Il est aujourd'hui admis qu'un RO donné peut reconnaître plusieurs molécules odorantes et qu'une molécule odorante

est capable d'activer différents récepteurs (*Figure 11*) (Malnic *et al.*, 1999). Cette caractéristique est essentielle car elle permet à l'individu de détecter et discriminer une myriade de molécules odorantes.

En effet, les molécules odorantes possèdent des structures chimiques très variées (par exemple : composés aromatiques ou aliphatiques, avec des fonctions alcools ou esters) et très fréquemment, un mélange de molécules est à l'origine d'une odeur. Cette capacité des RO à interagir avec plusieurs odorants est bien adaptée au codage d'un très vaste espace olfactif. Un autre point à mentionner est que le profil d'activation des RO peut varier en fonction de la concentration de l'odorant, ce qui peut générer une note odorante différente. L'activation d'une combinaison particulière de RO constitue donc la représentation primaire de l'odorant et définit le codage combinatoire des odorants au niveau périphérique (Malnic *et al.*, 1999).

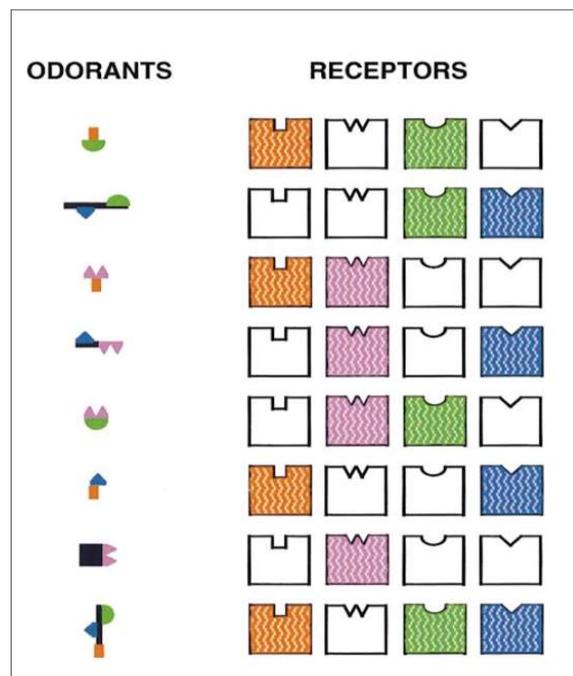


Figure 11 : Modèle de codage combinatoire des molécules odorantes par les récepteurs olfactifs. Les motifs de reconnaissance structuraux (ou odotopes) des odorants déterminent le type de récepteurs activés. Chaque odorant va générer un motif d'activation de récepteurs unique qui permet son codage au niveau périphérique. D'après Malnic *et al.*, 1999.

L'information olfactive est ensuite transmise des NSO vers les bulbes olfactifs. Les glomérules reçoivent les projections axonales des NSO exprimant les mêmes RO. Ainsi, suite à une stimulation olfactive composée de plusieurs odorants, on assiste à l'activation d'une carte spatiale unique au niveau des glomérules. Cette cartographie représente la signature olfactive de l'odeur détectée.

Ces informations sont ensuite transmises aux différentes structures du cortex olfactif par le biais des cellules mitrales des glomérules qui innervent en priorité le cortex piriforme, le cortex olfactif accessoire, le tubercule puis l'amygdale et le cortex entorhinal. Le pattern d'activation des aires olfactives centrales est moins stéréotypé puisque chaque structure reçoit des afférences en provenance de nombreux glomérules, quelle que soit leur localisation (Lepousez & Gheusi, 2011). L'activation des différentes aires cérébrales permet au cerveau de réaliser une synthèse de l'information reçue. L'ensemble des mécanismes mis en œuvre depuis la détection de l'odeur dans la cavité nasale jusqu'à l'intégration du signal au niveau des aires olfactives centrales participe à la réalisation de la carte mentale de l'odeur perçue (Grabe & Sachse, 2018).

8. Impact de l'état nutritionnel et de l'alimentation sur l'olfaction

Des travaux ont montré que la perception sensorielle d'un aliment peut varier en fonction du statut nutritionnel d'un individu. Le statut nutritionnel est défini par l'état de faim suite à un jeûne et l'état de satiété après un repas. Chez le rat, des études ont mis en évidence une meilleure sensibilité olfactive pour l'acétate d'isoamyle en condition de jeûne qu'en état de satiété (Aimé *et al.*, 2014). Il a également été montré que des rats à jeun passent plus de temps à explorer une odeur alimentaire que des rats rassasiés (Prud'homme *et al.*, 2009).

Les signaux olfactifs peuvent être modulés au niveau périphérique et central par l'action de différentes hormones dont le rôle est de réguler l'homéostasie énergétique. Ces hormones peuvent notamment agir au niveau du système olfactif périphérique pour stimuler (hormone orexigène) ou inhiber (hormone anorexigène) la prise alimentaire. La muqueuse olfactive contient en effet un ensemble de récepteurs capables de détecter la moindre modification du métabolisme énergétique d'un individu lié à son état nutritionnel (comme les récepteurs à l'insuline, à

la leptine ou aux orexines exprimés dans les NSO entre autres) (**Figure 12**) ((Prud'homme et al., 2009; Palouzier-Paulignan et al., 2012; Julliard et al., 2017).

En présence de pathologies multifactorielles comme l'obésité ou le diabète, des altérations de la physiologie olfactive ont été rapportées. La présence de troubles olfactifs chez des personnes atteintes d'obésité morbide a été relevée dans une étude à grande échelle utilisant des questionnaires d'auto-évaluation (Richardson *et al.*, 2004). Par ailleurs, 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).

En 2016, Rivière et al ont montré que des souris soumises à une alimentation riche en fructose développent rapidement un phénotype diabétique et présentent une altération des capacités de détection et de discrimination des odeurs. Ces effets délétères s'accompagnent d'une perturbation de la dynamique cellulaire au sein de la muqueuse olfactive ainsi qu'une plus faible sensibilité des NSO aux odorants (Rivière *et al.*, 2016).

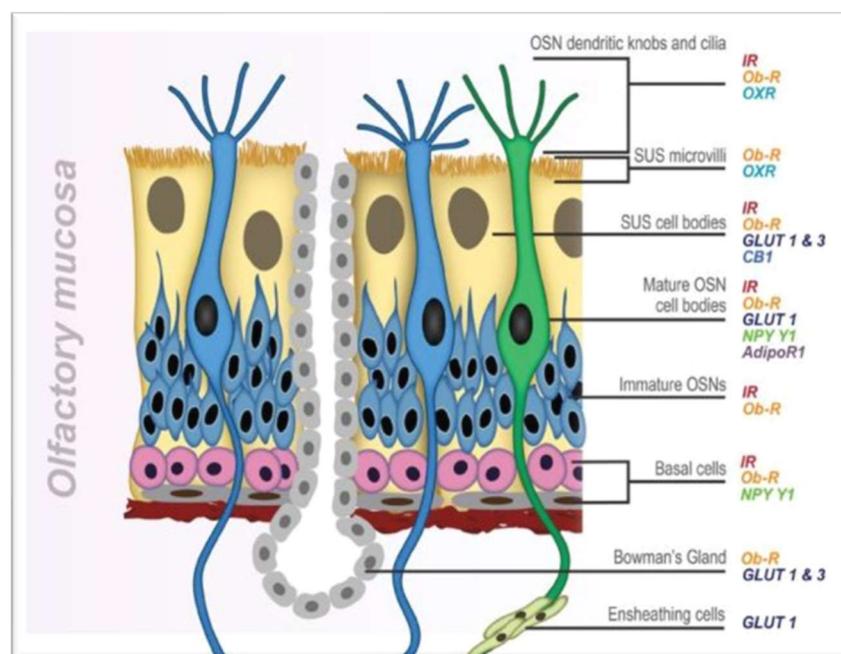


Figure 12 : Localisation cellulaire des récepteurs impliqués dans la régulation de l'homéostasie énergétique au niveau de la muqueuse olfactive; OSN = neurone olfactif sensoriel, IR = récepteur à l'insuline, Ob-R = récepteur à la leptine, OXR = récepteur aux orexines, GLUT = transporteur du glucose, CB1 = récepteur aux cannabinoïdes 1, SUS = cellules sustentaculaires, NPY Y1 = récepteur au neuropeptide Y1, AdipoR = récepteur à l'adiponectine. D'après Palouzier-Paulignan *et al.*, 2012.

La surconsommation d'aliments riches en lipides peut également contribuer à l'émergence de désordres métaboliques. Une étude récente a montré que les capacités olfactives de souris soumises à un régime hyperlipidique sont altérées (Thiebaud *et al.*, 2014). Ceci pourrait être lié à des modifications anatomiques de la muqueuse olfactive. Ces souris possèdent un nombre plus faible de NSO matures et une réduction du nombre d'axones en direction du bulbe olfactif a été observée. Cette étude démontre qu'un régime alimentaire déséquilibré en lipides peut avoir un impact important sur l'anatomie et la fonctionnalité du système olfactif périphérique.

Deux autres études ont montré qu'un régime alimentaire déficient en acides gras polyinsaturés n-3 altère les capacités olfactives de rats. Les auteurs de ces études suggèrent que les modifications de la composition lipidique du cerveau provoquées par ce régime pourraient affecter le fonctionnement des structures cérébrales impliquées dans le traitement de l'information olfactive ainsi que dans les zones impliquées dans les processus de mémoire. Cependant l'impact d'un tel régime sur l'anatomie et la fonctionnalité du système olfactif périphérique n'a pas été exploré à ce jour.

Par ailleurs, il est intéressant de noter que l'Homme et les rongeurs ont une préférence spontanée pour les aliments riches en lipides (Takeda *et al.*, 2001). L'existence dans les tissus sensoriels de récepteurs capables de détecter la présence de certains types de lipides comme les acides gras pourrait expliquer cette préférence. En 2015, une étude a montré que certains NSO présents au sein de la MO de souris expriment le récepteur CD36 (Oberland *et al.*, 2015). Ce récepteur est impliqué dans la détection des acides gras notamment au niveau des papilles gustatives et des neurones de l'hypothalamus. Il jouerait un rôle dans la régulation de la balance énergétique et le comportement alimentaire (Martin *et al.*, 2011; Julliard *et al.*, 2017).

CHAPITRE 2 : Les lipides

Les lipides sont des composés présents de manière ubiquitaire dans le règne végétal et animal. Dans le règne animal, ils peuvent être apportés par l'alimentation ou synthétisés de novo. Ils ont la particularité d'être impliqués dans de nombreuses fonctions biologiques. Comme les glucides et les protéines, les lipides sont utilisés comme une source d'énergie (1 g de lipides \approx 9.3 Kcal). Ils jouent de nombreux rôles dans la signalisation cellulaire et contribuent au bon fonctionnement de l'homéostasie cellulaire. Enfin, grâce à leur structure, ce sont des constituants majeurs des membranes biologiques.

1. Définition

Les lipides sont généralement décrits comme étant des molécules insolubles dans l'eau et solubles dans les solvants organiques.

En fonction de leur structure, on trouve des lipides apolaires (lipides de réserve), des lipides amphiphiles possédant à la fois un groupement polaire et apolaire (lipides de structure) et des composés à caractère lipidique comprenant les lipides isoprénoïdes (terpènes et leurs dérivés, certaines vitamines ainsi que les dérivés des stérols) et les eicosanoïdes.

2. Classification des lipides

Dans le monde du vivant, il existe un nombre considérable de lipides dont la structure est plus ou moins complexe. Cette grande diversité a nécessité la création et la mise en place d'une nomenclature qui a été publiée par IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature en 1977 (Hoppe-Seyler's Zeitschrift für Physiologische Chemie, 1977). Depuis, plusieurs bases de données ont été développées pour proposer une version améliorée de cette classification

notamment « AOCS Lipid Library », le « Cyberlipid Center » et plus récemment le « Lipid MAPS » (Fahy *et al.*, 2005).

Dans ce chapitre je détaillerai la classification des lipides en utilisant la nomenclature publiée par l'IUPAC-IUB en 1977 basée sur leur structure chimique. On distingue deux grandes catégories : les lipides constitués à partir d'acides gras et les composés à caractère lipidique (les isoprénoïdes et les eicosanoïdes). Il est important de noter que le précurseur des eicosanoïdes est l'acide arachidonique appartenant à la famille des acides gras polyinsaturés n-6 dont je parlerai plus loin dans ce chapitre.

Les lipides contenant des acides gras sont répartis en 3 groupes (**Figure 13**) (Ledoux, 2012) :

- Les acides gras
- Les lipides simples
- Les lipides complexes

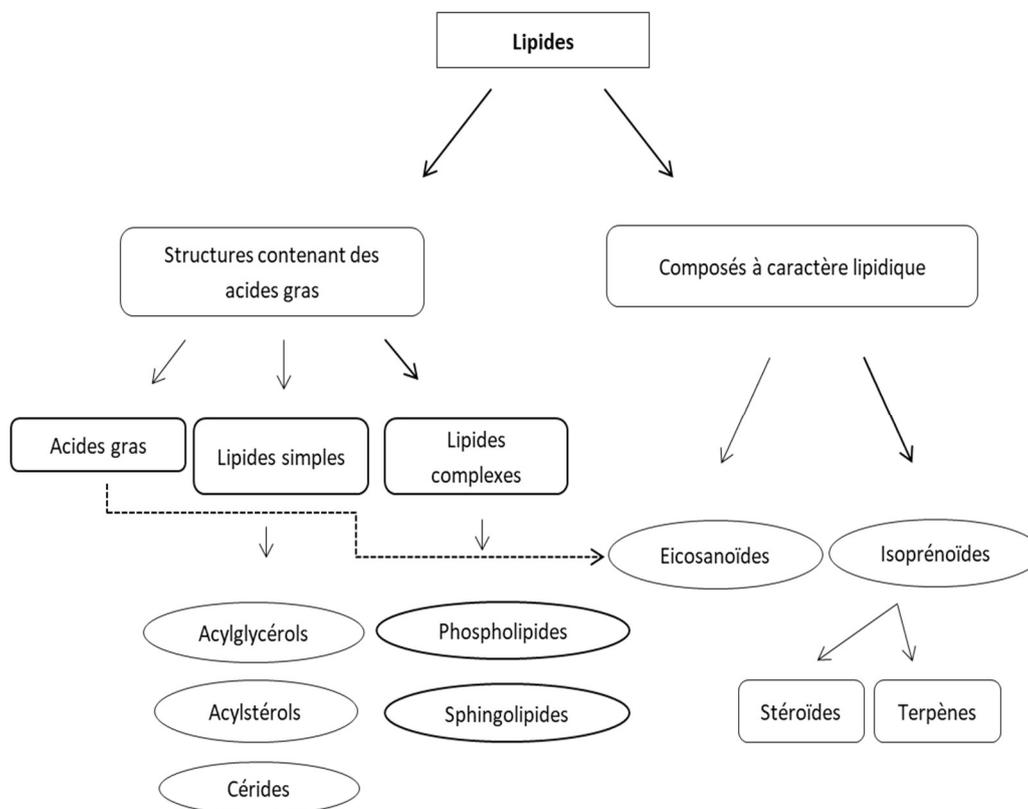


Figure 13 : Schéma récapitulatif de la classification des lipides en fonction de leur structure chimique

a. Les acides gras

Les acides gras (AG) sont les lipides les plus simples. Ils constituent l'élément de base de nombreux lipides plus complexes comme les phospholipides et les sphingolipides (*Figure 14*) (Ledoux, 2012) .

Ce sont des chaînes hydrocarbonées aliphatiques dont la formule générale est :



groupe méthyle - chaîne carbonée - groupe carboxyle

Figure 14 : Formule générale d'un acide gras. D'après Ledoux 2012.

Les acides gras sont désignés en fonction du nombre d'atomes de carbone de la chaîne carbonée, de la nature des liaisons (saturée ou insaturée) ainsi que de leur nombre et de leur position. Ils sont notés « n:m », n représentant le nombre de carbone et m le nombre de double liaison (Guesnet *et al.*, 2005).

Les acides gras sont répartis en trois groupes structuraux en fonction du degré d'insaturation de la chaîne hydrocarbonée.

- Les acides gras saturés

Les acides gras saturés (AGS) ne possèdent aucune double liaison. L'acide palmitique (16:0) et l'acide stéarique (18:0) sont les plus abondants dans le monde du vivant.

- Les acides monoinsaturés

Les acides gras monoinsaturés (AGMI) possèdent une double liaison. Ils font partie de la com-

position de nombreux lipides plus complexes. L'acide oléique (18:1) est le plus représenté dans les aliments.

- Les acides gras polyinsaturés

Les acides gras polyinsaturés (AGPI) possèdent plusieurs doubles liaisons. Ils comportent généralement deux à trois doubles liaisons mais certains AGPI à longues chaînes (> 20 carbones) peuvent présenter 5 à 6 doubles liaisons. Pour repérer la première double liaison, la numérotation n-x (anciennement « ω ») est utilisée avec x correspondant à la position du carbone portant la première double liaison à partir de l'extrémité méthyle.

Dans cette classe, on trouve deux grandes familles : les AGPI de la série n-3 et les AGPI de la série n-6. L'acide α-linolénique (ALA ; 18 :3 n-3) est le précurseur métabolique de la série n-3 et l'acide linoléique (LA ; 18 :2 n-6) est celui de la série n-6 (**Figure 15**) (Ledoux, 2012). LA et ALA sont des AGPI dits essentiels. Ils doivent être apportés par l'alimentation car les mammifères ne possèdent pas les enzymes (désaturases) capables de les synthétiser. Les voies de synthèse métaboliques et les fonctions des AGPI seront présentés plus en détail un peu plus loin dans ce chapitre.



Figure 15 : Structure moléculaire de l'acide linoléique (LA) appartenant à la famille des AGPI n-6 et de l'acide α-linolénique (ALA) appartenant à la famille des AGPI n-3. D'après Ledoux, 2012 :

b. Les lipides simples

Les lipides simples sont uniquement composés d'atomes de carbone, d'hydrogène et d'oxygène. Ils sont subdivisés en 3 groupes : les acylglycérols, les acylstérols et les cérides.

- Les acylglycérols

Ce sont des esters de glycérol et d'acides gras. Ils constituent des lipides de réserve. Ce sont des molécules apolaires et hydrolysables par des enzymes appelés lipases. Dans notre alimentation, ils sont présents dans les graisses animales et dans les huiles végétales. Les plus connus sont les triacylglycérols communément appelés triglycérides. Ils représentent environ 95 à 98 % des lipides issus de notre alimentation (Anses, 2015).

- Les acylstérols

Ce sont des esters de stérols et d'acide gras. Ils regroupent les dérivés du cholestérol dans le règne animal et les phytostérols dans le règne végétal.

- Les cériques

Ce sont des esters d'alcools gras à longues chaînes le plus souvent saturées et d'acides gras également à longues chaînes. Ils sont très apolaires. Dans le règne du vivant, on les trouve principalement dans les cires.

c. Les lipides complexes

Les lipides complexes, en plus d'être constitués d'atomes de carbone, d'hydrogène et d'oxygène, possèdent des atomes de phosphore, azote et/ou de soufre. Ils incluent les phospholipides et les sphingolipides (Ledoux, 2012) .

- Les phospholipides

Les phospholipides (PL) sont des molécules amphiphiles c'est-à-dire qu'ils possèdent à la fois une région hydrophile (tête) et région hydrophobe (queue). Du fait de très nombreuses combinaisons possibles entre la tête hydrophile et la partie hydrophobe, il existe une très grande variété de PL.

Les PL ont pour structure commune un radical glycérol estérifié en positions sn-1 et sn-2 par des acides gras et par l'acide phosphorique en position sn-3. De manière générale, l'acide gras situé en position sn-1 du glycérol est très fréquemment un acide gras saturé alors que celui situé en sn-2 est préférentiellement un acide gras polyinsaturé (**Figure 16**) (Alberts *et al.*, 2002).

Grâce à une liaison phosphodiester le groupe phosphate peut se lier de manière covalente à différents groupes hydrophiles comme l'hydrogène, le glycérol, la choline, l'éthanolamine, la sérine ou l'inositol. Différentes classes de phospholipides comme l'acide phosphatidique (PA), le phosphatidylglycérol (PG), la phosphatidylcholine (PC), la phosphatidyléthanolamine (PE), la phosphatidylsérine (PS) et le phosphatidylinositol (PI) ont ainsi été identifiées (Mouritsen, 2005; Deamer, 2017).

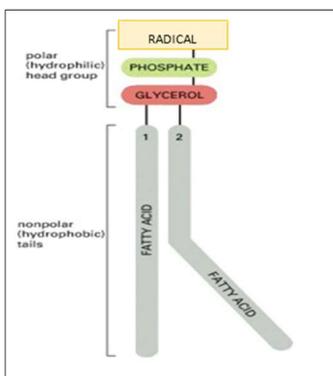


Figure 16 : Représentation d'un glycérophospholipide.

La partie hydrophile est composée d'un radical glycérol et d'un groupe phosphate pouvant se lier à d'autres groupes hydrophiles. La partie hydrophobe est composée de deux acides gras liés au glycérol. D'après Alberts, 2002.

- Les Plasmalogènes

Comme les PL, les plasmalogènes (Pls) ont pour structure commune un radical glycérol estérifié en position sn-2 par un acide gras et par l'acide phosphorique en position sn-3 (**Figure 17**). De manière générale, ce dernier est une PC ou une PE et dans une moindre mesure un PI et PS.

La particularité des Pls réside en la présence d'une liaison vinyl ether permettant de porter un alcool gras en position sn-1 de la base glycérol.

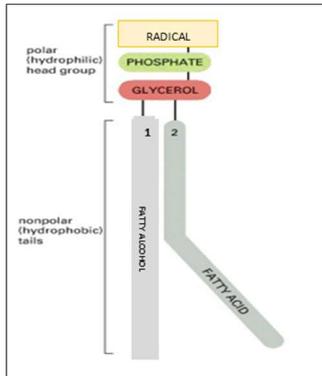


Figure 17 : Représentation d'un plasmalogène

La partie hydrophile est composée d'un radical glycérol et d'un groupe phosphate pouvant se lier à d'autres groupes hydrophiles. La partie hydrophobe est composée d'un alcool gras et d'un acide gras liés au glycérol. D'après Alberts, 2002.

- Les sphingolipides

Les sphingolipides sont composés d'un radical sphingosine et se divisent en deux groupes : les sphingophospholipides et les sphingoglycolipides.

➤ Les sphingophospholipides

Les sphingomyélines (SM) sont les sphingolipides les plus abondants chez les eucaryotes. Ces composés sont formés d'un squelette sphingosine qui se lie par une liaison amide à un acide gras (céramide) et par une liaison ester à la choline (**Figure 18**) (Casares *et al.*, 2019) .

Les SM sont majoritairement composées d'un acide gras saturé ou mono-insaturé et très rarement d'un acide gras polyinsaturé, engendrant différentes espèces de SM (Mencarelli & Martinez-Martinez, 2013; Bienias *et al.*, 2016).

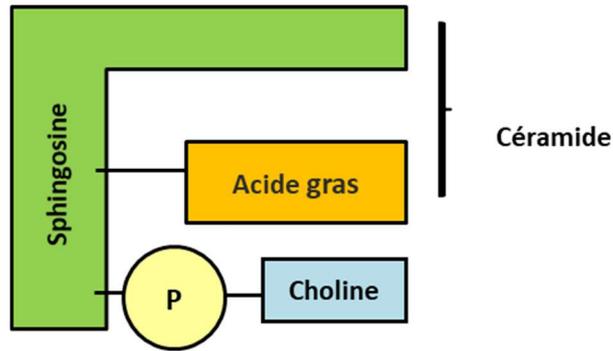


Figure 18 : Représentation de la sphingomyéline. D'après Casarès *et al.*, 2019.

➤ Les sphingoglycolipides

Les sphingoglycolipides (GSL) constituent une vaste famille de lipides présents au sein des membranes. Ils sont très abondants dans le cerveau et le système nerveux. Cette vaste famille regroupe les sphingoglycolipides neutres (cérébrosides et oligo-glycosyl-céramides), les gangliosides, les sulfatides et les fucolipides. Ils sont majoritairement formés d'au moins un résidu glycosylé sous forme monosaccharide et d'un céramide (**Figure 19**).

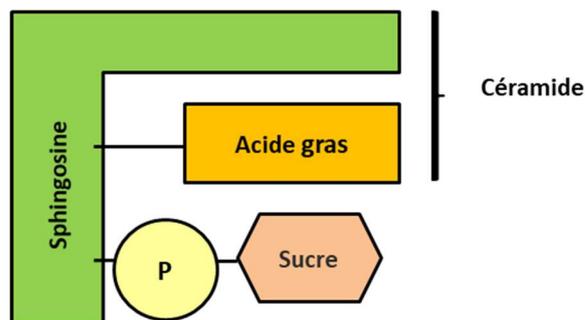


Figure 19 : Représentation d'un sphingoglycolipide. D'après Casarès *et al.*, 2019.

3. Les acides gras polyinsaturés

Les AGPI ont un rôle structural lorsqu'ils sont incorporés dans les phospholipides membranaires. Certains AGPI servent également de précurseurs pour la synthèse des AGPI à longue chaîne (>20 carbones) et pour la synthèse de médiateurs lipidiques oxygénés appelés eicosanoïdes. Ces médiateurs sont impliqués dans diverses fonctions physiologiques clés comme l'inflammation, la coagulation ou l'activité neuronale (Guesnet *et al.*, 2005).

a. Synthèse des AGPI

Après absorption, les précurseurs des AGPI n-6 et n-3, respectivement LA et ALA, sont convertis en AGPI à chaîne longue (AGPI-LC) par une série de réactions enzymatiques assurées par des désaturases (ajout de doubles liaisons) et d'élongases (ajout de deux atomes de carbone) (**Figure 20**).

Il n'est pas possible de synthétiser à partir d'AGPI de la série n-6 des AGPI de la série n-3 et vice versa. En fait, LA et ALA sont en compétition pour l'utilisation des enzymes $\Delta 5$ et $\Delta 6$ désaturases qui permettent la synthèse des AGPI-LC. Lorsque l'apport nutritionnel est équilibré, la synthèse des AGPI n-6 s'achève à l'acide arachidonique (AA) et les enzymes sont de ce fait disponibles pour synthétiser des AGPI-LC de la série n-3.

Par contre, si l'apport alimentaire est déficient en AGPI-LC n-3 et notamment en acide docosahexanoïque (DHA), la voie de synthèse des AGPI n-6 se poursuit afin de fournir de l'acide docosapentanoïque (DPA n-6), l'homologue métabolique du DHA. Ces deux AGPI sont très proches en terme de structure, ne se différenciant uniquement par la position de la double liaison en position n-3 sur la chaîne carbonée au lieu d'une position en n-6.

Au niveau cérébral, la synthèse endogène d'EPA et de DHA est faible. Pour maintenir le niveau de ces AGPI, le cerveau dépend de l'alimentation et du métabolisme hépatique (Simopoulos, 2010; Dyll, 2015).

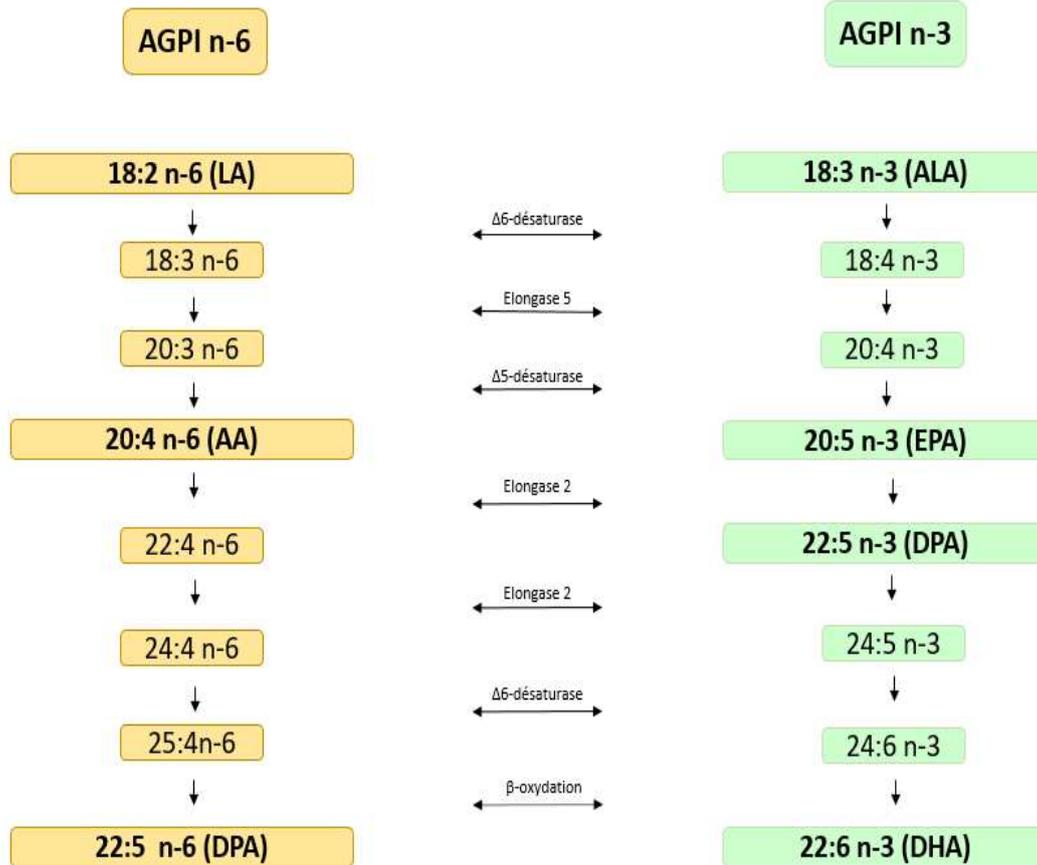


Figure 20 : Voies de biosynthèse des AGPI de la série n-6 et n-3

b. Rôles physiologiques des AGPI

Depuis plusieurs décennies, de très nombreuses études à la fois expérimentales chez le rongeur et cliniques chez l'Homme ont été menées pour explorer les mécanismes d'action des AGPI-LC et de leurs dérivés. On sait aujourd'hui qu'en fonction de la série à laquelle ils appartiennent, les AGPI et leurs métabolites ont des rôles différents.

Dans cette partie, je décrirai les mécanismes majeurs dans lesquels ils sont impliqués.

- Rôle structural

Les AGPI incorporés dans les PL membranaires peuvent modifier les propriétés physico-chimiques de la membrane cellulaire et ainsi moduler l'activité inter et intracellulaire.

La compétition entre les voies de biosynthèse des AGPI-LC n-6 et n-3 permet de maintenir le degré d'insaturation des PL membranaires. En effet, si le niveau membranaire de DHA diminue, il est compensé par une augmentation de DPA de la série n-6. Bien que ce dernier soit l'équivalent structural du DHA dans la série n-6, ces changements au niveau des PL membranaires peuvent perturber les propriétés physico-chimiques de la membrane (Dyall, 2015).

Lorsqu'ils sont intégrés à la membrane, les AGPI peuvent intervenir directement en favorisant la mise en place d'un microenvironnement peu ordonné et flexible propice aux changements de conformation des protéines transmembranaires, ce qui facilite la signalisation cellulaire. Ils peuvent également favoriser la formation de microdomaines membranaires appelés « rafts ». La formation de ces rafts correspond à la ségrégation de domaines membranaires ordonnés et moins flexibles auxquels sont associés des complexes protéiques (Simons & Sampaio, 2011). Je détaillerai la composition et le fonctionnement de la membrane plasmique dans la partie de ce chapitre.

Plusieurs études ont mis en évidence que la teneur membranaire en AGPI et notamment en DHA peut moduler la signalisation cellulaire. Les études menées par Niu et al en 2004 ont montré que la cascade de transduction du signal visuel est modifiée dans les cellules photoréceptrices de la rétine chez des rats soumis à un régime déficient en DHA. En effet, dans ces cellules, la formation du complexe MII-Gt c'est-à-dire du complexe entre la rhodopsine et la protéine G associée est plus lente, ce qui entraîne une diminution du niveau d'activation de la rhodopsine et de l'activité de la phosphodiesterase, une enzyme responsable de l'hydrolyse du cGMP et de la fermeture des canaux cGMP- dépendent dans ces cellules (Niu *et al.*, 2004).

D'autres travaux ont montré que des régimes déficients en AGPI n-3 chez le rat pouvaient perturber le stockage et la libération présynaptique de neurotransmetteurs comme l'acétylcholine et la sérotonine (Aïd *et al.*, 2003; Kudas *et al.*, 2004). Les auteurs suggèrent que les effets observés pourraient être dus à des modifications de la fluidité membranaire.

Des études rapportent également l'impact délétère d'un régime alimentaire appauvri en AGPI n-3 et notamment en DHA sur la neurotransmission (Chalon, 2006; Mathieu *et al.*, 2010). Dans ces études, les auteurs suggèrent que l'appauvrissement en DHA dans les PL membranaires perturberait la maturation des vésicules synaptiques ainsi que le stockage et la libération des neurotransmetteurs (Alessandri *et al.*, 2004). Ces dysfonctionnements pourraient être à l'origine des nombreux effets observés au niveau des fonctions cérébrales dans différents modèles expérimentaux.

- Les AGPI comme précurseurs des médiateurs lipidiques

Parmi les AGPI -LC, l'acide arachidonique (AA) et l'acide dihomoglycolénique pour la série n-6 et l'acide eicosapentanoïque (EPA) pour la série n-3 peuvent, par des réactions d'oxygénation, d'hydroxylation et de peroxydation, donner naissance à des médiateurs lipidiques appelés eicosanoïdes (**Figure 21**) (Guesnet *et al.*, 2005).

Les AGPI-LC incorporés dans les PL membranaires sont libérés dans le cytoplasme sous l'action des phospholipases A2 (PLA2). L'AA et l'EPA peuvent ensuite être utilisés pour synthétiser des prostaglandines ou des thromboxanes par la voie des cyclooxygénases (COX), ou pour synthétiser des leukotriènes et des acides gras hydroperoxydés par la voie des lipoxygénases (LOX) (Simopoulos, 2002).

Les médiateurs lipidiques dérivés de l'AA sont des molécules aux propriétés diverses. Elles peuvent être proagrégantes et vasoconstrictrices (endoperoxydes de la série 2) ou encore pro-inflammatoires (leucotriènes de la série 4). Cependant, lors d'une réponse inflammatoire aiguë, l'AA peut servir de précurseur à la production d'eicosanoïdes (lipoxines) impliqués dans les mécanismes de résolution de l'inflammation (Dangi *et al.*, 2009; Chianese *et al.*, 2018).

L'AA peut également être métabolisé en lipides bioactifs. Plusieurs études se sont intéressées aux rôles des endocannabinoïdes (eCB), l'anandamide (aussi connu sous le nom de N-arachidonoyléthanolamide) et le 2-arachidonyleglycérol, deux dérivés de l'AA. Ces deux molécules sont des agonistes des récepteurs aux cannabinoïdes CB1 et CB2. Ces récepteurs sont impliqués dans de nombreux mécanismes physiologiques comme l'addiction, la stimulation de la prise alimentaire, l'obésité, le contrôle de l'homéostasie énergétique ou encore l'inflammation

(Kirkham *et al.*, 2006). Une étude menée par Lafourcade et al en 2011 a montré qu'un régime déséquilibré en AGPI n-3 était associé à des altérations de la plasticité synaptique dans le cortex préfrontal chez la souris. Au niveau mécanistique, il a été montré que ces altérations étaient dues à un couplage partiellement fonctionnel entre le récepteur CB1 et la protéine G qui lui est associée au niveau des synapses, provoquant ainsi une désensibilisation du récepteur (Lafourcade *et al.*, 2011).

A l'inverse des médiateurs lipidiques dérivés de l'AA, les dérivés lipidiques de l'EPA et du DHA sont des molécules aux propriétés anti-agrégantes et vasodilatatrices (endopéroxydes de la série 3), non inflammatoires (leucotriènes de la série 5 dont les résolvines et les maresines) et neuroprotectrices (protectines) (Serhan *et al.*, 2015). La neuroprotectine D1 par exemple est connue pour inhiber l'apoptose neuronale dans la lignée cellulaire issue de l'épithélium pigmentaire de la rétine suite à un stress oxydatif (Bazan, 2009). De même le DPA de la série n-6 peut conduire à la production de dérivés hydroxylés ayant des propriétés anti-inflammatoires (Dangi *et al.*, 2009).

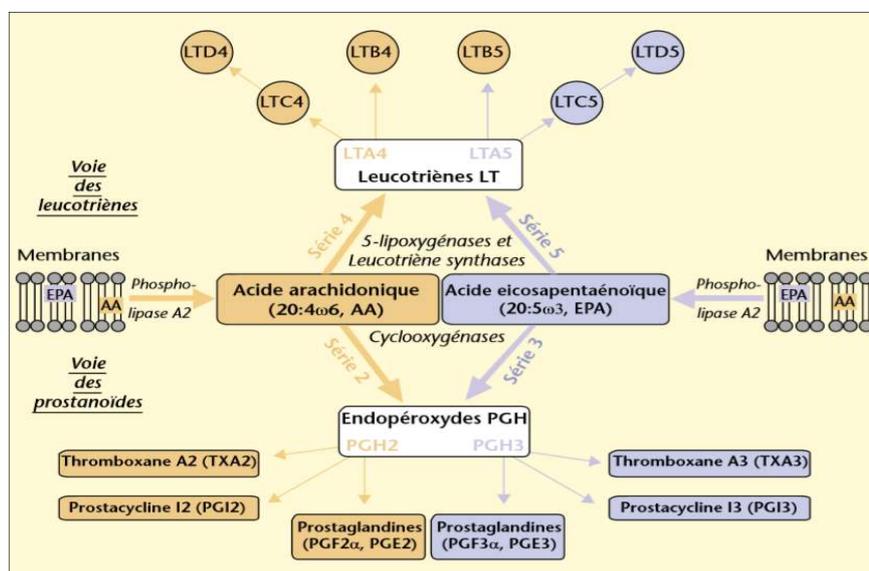


Figure 21 : Voies de biosynthèse des dérivés métaboliques des AGPI-LC. Guesnet *et al.*, 2005

- Les AGPI comme modulateurs de l'expression génique

En 1993, Gottlicher et al ont démontré pour la première fois que des AGPI peuvent activer des récepteurs nucléaires et réguler l'expression des gènes (Göttlicher *et al.*, 1993). Depuis, de très nombreuses études ont montré que les AGPI peuvent interagir avec plusieurs facteurs de transcription (Alessandri *et al.*, 2004). Ces facteurs de transcription sont :

- PPAR pour « peroxisome proliferator-activated receptors ». Ce sont des facteurs de transcription qui, en se liant aux acides gras, peuvent induire la transcription de gènes impliqués dans la β -oxydation mitochondriale et peroxysomale.
- RXR pour « retinoid X receptor ». Les RXR régulent la majorité des gènes impliqués dans le métabolisme des lipides en interagissant avec d'autres facteurs de transcription comme le liver X Receptor (LXR).
- LXR pour « liver X receptors ». Ce sont des récepteurs nucléaires capables de se lier aux oxystérols. Ils sont impliqués dans le métabolisme du cholestérol et la régulation de la réponse inflammatoire dans les macrophages.
- SREBP-1c pour « sterol regulatory element binding protein-1c ». Ce facteur de transcription est impliqué dans la transduction du signal à l'insuline.
- HNF4 pour « hepatic nuclear factor 4 ». Ce récepteur nucléaire est principalement exprimé dans le foie.

En interagissant avec ces facteurs de transcription, les AGPI n-3 sont capables de moduler le niveau d'expression des gènes cibles de ces récepteurs nucléaires. Par exemple, les AGPI n-3 peuvent activer le facteur de transcription PPAR γ qui en retour va inhiber NF- κ B, ce qui aura pour conséquence d'inhiber la production de cytokines pro-inflammatoires (**Figure 22**) (Sampath & Ntambi, 2004; Guesnet *et al.*, 2005).

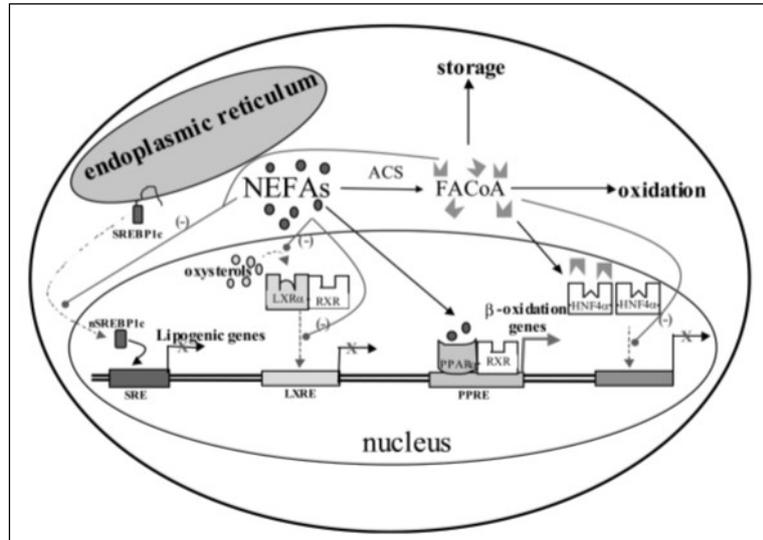


Figure 22 : Schéma récapitulatif présentant les différents mécanismes par lesquels les acides gras non estérifiés (NEFAs) peuvent interagir avec les facteurs de transcription PPAR, RXR, LXR, HNF4. Par exemple, la liaison directe entre NEFAs et PPAR peut activer l'expression des gènes cibles de PPAR. Les NEFAs peuvent également avoir un rôle inhibiteur en empêchant la liaison des oxystérols aux récepteurs nucléaires LXR. Dans ce cas, ils agissent pour favoriser la répression des gènes cibles du facteur de transcription. D'après Sampath & Ntambi, 2004.

Il est important de noter qu'il existe des récepteurs capables de détecter les AG libres : ce sont les FFARs ou « free fatty acid receptors ». Cette famille de récepteurs appartient à la superfamille des récepteurs couplés aux protéines G (Dragano *et al.*, 2017; Falomir-Lockhart *et al.*, 2019). Dans cette famille, FFAR1 (GPR40) et FFAR4 (GPR120) sont deux récepteurs intéressants car ils sont fortement exprimés dans le système nerveux central et ont la particularité de se lier aux AGPI-LC à longue chaîne. FFAR1 se lie avec la même affinité aux AGMI et aux AGPI. Quant à FFAR4, il se lie naturellement à différents AGS (C14, C16 et C18). Dans l'hypothalamus de souris, l'activation de FFAR4 dans la microglie améliore la réponse neuroinflammatoire en diminuant la production de cytokines pro inflammatoires (TNF α et IL-1 β) et en favorisant la production de cytokines anti-inflammatoires (IL-6 et IL-10) (Falomir-Lockhart *et al.*, 2019).

4. AGPI et tissus nerveux

a. Le système nerveux central et la rétine

Le système nerveux central est le tissu le plus riche en lipides après le tissu adipeux. Il contient environ 50% de lipides principalement présents au niveau de la membrane des cellules sous forme de cholestérol ou de PL (Sastry, 1985)

Dans le cerveau de rat, les PL majoritaires sont les phosphatidyléthanolamines (PE), les phosphatidylcholines (PC) et les phosphatidylsérines (PS). Ils représentent respectivement 54%, 31% et 8 % des phospholipides totaux (Choi *et al.*, 2018). Dans la rétine des mammifères, les mêmes classes de PL sont majoritaires. Les PE constituent 40 % des phospholipides totaux tandis que les PS et les PC constituent respectivement 12% et 10% des phospholipides totaux du tissu (Anderson & Maude, 1970).

Le DHA et l'AA sont les AGPI-LC majoritairement présents sous forme estérifiés dans les PL membranaires du tissu nerveux. Les membranes des cellules du cerveau et de la rétine ont la particularité de contenir des taux très élevés de ces deux AGPI.

Chez l'Homme, le DHA et l'AA constituent respectivement 20 % et 15% environ des AG totaux du cerveau ; dans la rétine, le DHA et l'AA représentent respectivement 30% et 5% des AG totaux (Guesnet *et al.*, 2005; Bascoul-Colombo *et al.*, 2016). On retiendra que dans le cerveau humain, le DHA est majoritairement présent dans les PE et les PS alors que l'AA est principalement incorporé dans les PE, les PC et les PI (Svennerholm, 1968). Chez le rongeur, ces taux sont un peu différents au niveau du cerveau puisque le DHA et l'AA représentent respectivement 12-14% et 8-10% des AG totaux. Dans la rétine de souris, les taux de DHA et d'AA sont similaires à ceux trouvés chez l'Homme. La teneur de ces deux AGPI dans les PL membranaires varie au sein des différentes structures du cerveau (Joffre, 2019).

Au cours des dernières décennies, de nombreuses études ont montré qu'un régime déficient en AGPI n-3 aboutissait d'une part à un appauvrissement en DHA et d'autre part à un enrichissement en DPA n-6 dans les membranes cellulaires de la rétine et du cerveau. Cet appauvrisse-

ment membranaire a de multiples conséquences en particulier au niveau cognitif, comportemental ou encore au niveau de la discrimination visuelle chez l’homme, l’enfant et les rongeurs (Guesnet *et al.*, 2005; Chianese *et al.*, 2018).

b. La muqueuse olfactive

En ce qui concerne la muqueuse olfactive, quelques études se sont intéressées à la composition lipidique de ce tissu chez le bovin, le rat et le porc (Koyama & Kurihara, 1972; Russell *et al.*, 1989; Lobasso *et al.*, 2010). En 2010, grâce aux techniques de lipidomique, Lobasso et al ont analysé les lipides complexes présents dans les membranes provenant de tissu olfactif de porc (Lobasso *et al.*, 2010). Les résultats montrent que la MO de porc est composée d’environ 90% de PL. Les PE, PC et SM (ou Cer-P-Cho) sont les classes majoritaires ; les PS et PI sont présents en plus faible quantité. L’AA est l’AGPI le plus représenté dans les PL tandis que les AGS sont les seuls AG incorporés dans les SM. Dans les cils olfactifs isolés à partir de la MO, la répartition des PL est différente. Les auteurs montrent que la teneur en PE est en plus faible quantité tandis que S-Gal-Cer, un sulfatide, est majoritaire.

En 2018, une nouvelle étude a été menée chez des rongeurs (rat et souris) afin d’analyser de manière approfondie les acides gras et les PL présents dans la muqueuse olfactive de ces espèces (**Tableau 1**) (Le Bon *et al.*, 2018). Les résultats ont confirmé le fait que les PL sont majoritaires dans ce tissu et ont montré que la quantité de triacylglycérol est un peu plus élevée dans le tissu olfactif de souris que dans celui de rat.

Tableau 1 : Distribution des classes de lipides dans la muqueuse olfactive de souris et de rats. Les valeurs sont des moyennes \pm esm (n= 4). (Le Bon *et al.*, 2018).

	Mouse % of total lipids ^a	Rat
Cholesterol	9.8 \pm 1.2	9.3 \pm 0.7
Triacylglycerols	8.3 \pm 0.7	2.5 \pm 0.4
Phospholipids	81.9 \pm 1.9	88.3 \pm 0.7

Les AGPI majoritaires dans la muqueuse olfactive de souris et de rat sont l'AA pour la série n-6 et le DHA pour la série n-3 (**Tableau 2**). Ces résultats indiquent que la composition de la muqueuse olfactive en acides gras présente de fortes similitudes avec celle du cerveau et de la rétine.

Tableau 2 : Composition en acides gras de la muqueuse olfactive de souris et de rats.

Les valeurs sont des moyennes \pm esm ; (n = 7 à 11). D'après Le Bon *et al.*, 2018.

Acides Gras (% des AG totaux)	Souris	Rat
18:2n-6 (LA)	0.17 \pm 0.02	0.13 \pm 0.01
20:4n-6 (AA)	11.73 \pm 0.29	17.56 \pm 0.56
22:5n-6 (DPA n-6)	0.49 \pm 0.04	2.10 \pm 0.1
18:3n-3 (ALA)	0.52 \pm 0.04	0.31 \pm 0.02
20:5n-3 (EPA)	0.80 \pm 0.04	0.29 \pm 0.11
22:6n-3 (DHA)	11.77 \pm 0.42	11.46 \pm 4.41
AGS	43.29 \pm 0.79	39.70 \pm 0.84
AGMI	16.90 \pm 0.20	14.97 \pm 0.32
AGPI	34.54 \pm 0.81	39.09 \pm 1.10
Total AGPI n-6	20.12 \pm 0.45	25.79 \pm 0.71
Total AGPI n-3	13.86 \pm 0.47	12.76 \pm 0.49
Ratio n-6/n-3	1.45 \pm 0.05	2.02 \pm 0.06

L'analyse des différentes classes de PL montre que les PC, les PE et les PI sont majoritaires dans ce tissu (respectivement 55%, 15% et 12% chez la souris et 48%, 25% et 12 % chez le rat) (**Figure 23**). Ce profil diffère légèrement de celui observé dans le cerveau et la rétine de rongeurs. Dans ces tissus, les PE, PC et PS sont les classes les plus abondantes (Anderson & Maude, 1970; Choi *et al.*, 2018).

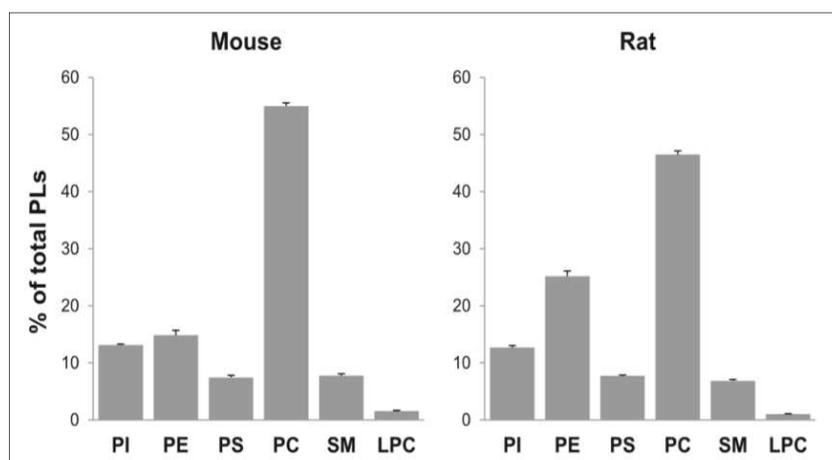


Figure 23 : Répartition des phospholipides dans le tissu olfactif de souris et de rats. Les valeurs sont des moyennes \pm esm ; n = 12 pour les souris et n = 8 pour les rats. D'après Le Bon *et al.*, 2018.

5. Les lipides de la membrane plasmique

Les propriétés physico-chimiques des protéines et des lipides qui composent la membrane cellulaire influencent la composition, l'organisation et les différents mouvements de la bicouche lipidique.

a. Composition de la membrane plasmique

La membrane cellulaire joue le rôle essentiel de barrière entre le milieu intracellulaire et extracellulaire de la cellule. Elle est constituée d'une bicouche lipidique où interagit en permanence un mélange complexe de lipides et de protéines (*Figure 24*).

Les lipides structuraux de la membrane plasmique sont majoritairement les PL, les sphingolipides et le cholestérol. Les PL membranaires, grâce à leur propriété amphiphile, forment une bicouche lipidique dans laquelle s'insère un très grand nombre de protéines assurant différentes fonctions comme le transport des nutriments ou la signalisation cellulaire (Cournia *et al.*, 2015; Deamer, 2017; Sezgin *et al.*, 2017).

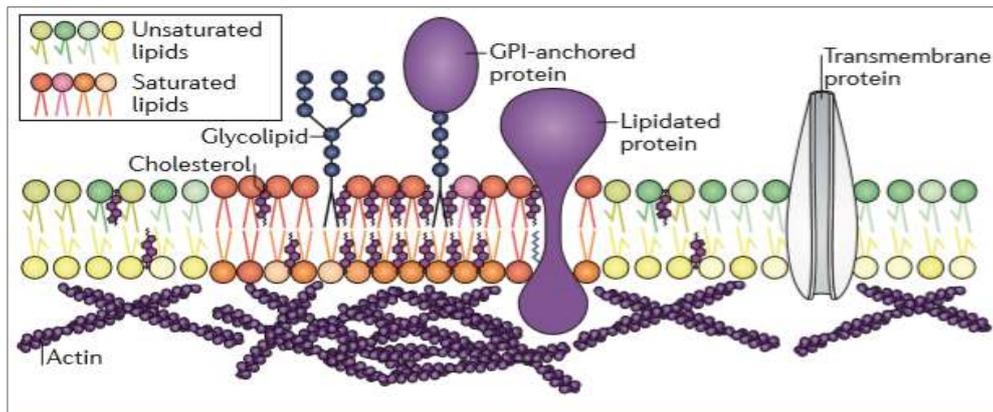


Figure 24 : Organisation de la membrane cellulaire. Les principaux constituants de la membrane cellulaire sont les phospholipides contenant différentes classes d'acides gras, le cholestérol, les sphingophospholipides, les protéines membranaires et transmembranaires et les dérivés glycosylés. D'après Sezgin *et al.*,2017.

- Les phospholipides membranaires

Les PL s'assemblent spontanément entre eux grâce à leurs propriétés hydrophiles et hydrophobes. La tête polaire contenant le groupe phosphate fait face à l'environnement aqueux que ce soit du côté intra ou extra cellulaire. A l'opposé la partie hydrophobe (correspondant aux acides gras estérifiés) se positionne à l'intérieur de la membrane.

La grande diversité des PL membranaires est directement liée aux différents acides gras qui peuvent les composer. La position, le nombre de double-liaisons et la structure spatiale (cis ou trans) des acides gras peuvent influencer la stabilité de la bicouche lipidique.

La composition lipidique de la membrane plasmique est déterminée par la synthèse de novo des PL et par le remodelage des PL existants grâce à des réactions de déacylation/réacylation. La composition en AGPI des PL membranaires est modulée par l'action d'enzymes comme les phospholipases ou les acyltransférases.

- Les plasmalogènes

Les plasmalogènes (PLs) ont également un rôle structural du fait de leur localisation dans les membranes des compartiments subcellulaires et dans les microdomaines de la membrane plasmique. La présence de la liaison vinyl-ether en sn-1 confère aux PLs une orientation différente dans la bicouche lipidique rendant la membrane plus dense. Ils ont également un rôle antioxydant et servent de réservoir d'AGPI-LC comme l'AA et le DHA pour la synthèse de seconds messagers et médiateurs lipidiques (Farooqui & Horrocks, 2001; Lacombe *et al.*, 2018).

- Les sphingophospholipides

Comme les PL, les sphingophospholipides peuvent moduler les propriétés physiques de la membrane et l'activité des protéines transmembranaires (Breslow & Weissman, 2010; Lingwood & Simons, 2010). La SM est le sphingolipide le plus abondant dans la bicouche lipidique en particulier dans le feuillet externe. L'hydrolyse de la SM aboutit à la libération de céramide connu pour jouer un rôle au niveau de la membrane (formation de microdomaines, recrutement de protéines, trafic cellulaire) et comme second messager dans la signalisation cellulaire en particulier lors de prolifération et l'apoptose cellulaires (Slotte, 2013; Kraft, 2016). La SM a également la capacité de se lier et d'interagir avec le cholestérol au sein de la membrane (Bienias *et al.*, 2016).

- Les glycolipides

Les glycolipides se situent essentiellement dans le feuillet externe des membranes plasmiques. La partie contenant les sucres est à l'extérieur de la cellule et est impliquée, entre autres, dans des fonctions de reconnaissance moléculaire (Malhotra, 2012).

- Le cholestérol

Le cholestérol appartient à la famille des stérols. Il est constitué de 4 cycles hydrocarbonés dont un possède un groupe alcool. Le cholestérol s'insère dans la bicouche en présentant ce groupement alcool en direction du milieu aqueux. Celui-ci peut alors interagir avec les PL et les sphingolipides environnants. Comme la SM, il est très abondant dans la membrane des cellules du système nerveux (Berg *et al.*, 2002). Au niveau structural, le cholestérol ordonne les acides gras présents dans la bicouche et confère à la membrane solidité et rigidité (Petrache *et al.*, 2005). Des fluctuations de la teneur membranaire en cholestérol influencent la fluidité membranaire ainsi que le trafic et la signalisation cellulaire (Subczynski *et al.*, 2017).

- Les protéines membranaires

La membrane plasmique contient de nombreuses protéines membranaires. Celles-ci sont présentes en quantités équivalentes à celles des lipides. Du fait de leur localisation, elles sont soumises aux contraintes biophysiques de la bicouche lipidique (Li *et al.*, 2012). Elles peuvent être classées en 2 groupes : les protéines périphériques et les protéines transmembranaires.

Les protéines périphériques regroupent les protéines ancrées au glyco-phosphatidyl inositol (GPI) présent sur la face extracellulaire de la membrane plasmique et les protéines ancrées par l'intermédiaire d'acides gras sur la face intracellulaire de la membrane.

Les protéines transmembranaires quant à elles traversent la bicouche lipidique. Elles sont synthétisées dans le réticulum endoplasmique puis insérées au niveau de la membrane avec une orientation qui leur est propre (Alberts *et al.*, 2002).

L'ensemble de ces protéines assurent de nombreuses fonctions physiologiques comme la transduction du signal, la prolifération cellulaire, l'apoptose.

- Les microdomaines ou rafts

Les microdomaines sont définis comme étant des domaines dynamiques d'échelle nanométrique enrichis en cholestérol et en sphingolipides où sont regroupés des protéines spécifiques pouvant être activées par des interactions lipides-lipides, lipides-protéines ou protéines-protéines. Les lipides ainsi regroupés au sein de cette « plateforme de signalisation » sont enrichis en AGS et en céramide (Hancock, 2006; Lingwood & Simons, 2010). Cette organisation permettrait de favoriser et de réguler les interactions entre les différents partenaires présents à la membrane.

b. Les propriétés de la membrane plasmique

- L'asymétrie membranaire

Les lipides ne sont pas distribués de manière homogène dans les deux feuillets de la bicouche lipidique. Le feuillet externe est principalement composé de sphingolipides (dont la SM), de PC et de glycolipides tandis que le feuillet interne est principalement constitué de PE, de PC et de PS. Le cholestérol constitue un peu moins de 50% des deux feuillets de la bicouche. Cette répartition asymétrique des lipides est responsable de l'organisation différente des feuillets de la membrane (**Figure 25**) (Ingólfsson *et al.*, 2017).

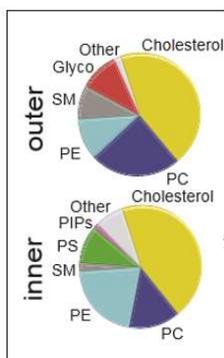


Figure 25 : Asymétrie membranaire

Estimation de la répartition des lipides membranaires dans le feuillet interne (inner) et externe (outer) de membranes plasmiques issues de neurones de cerveau humain. D'après Ingólfsson *et al.*, 2017.

- Les différentes phases de la membrane

En fonction des lipides présents, plusieurs organisations membranaires sont possibles (**Figure 26**) : la phase solide-ordonnée, la phase intermédiaire liquide-ordonnée et la phase liquide-désordonnée (Shaikh *et al.*, 2001; Mouritsen & Zuckermann, 2004) . La composition membranaire des lipides n'est pas figée. La membrane peut passer d'une phase à l'autre notamment grâce à l'action du cholestérol (Desai & Miller, 2018).

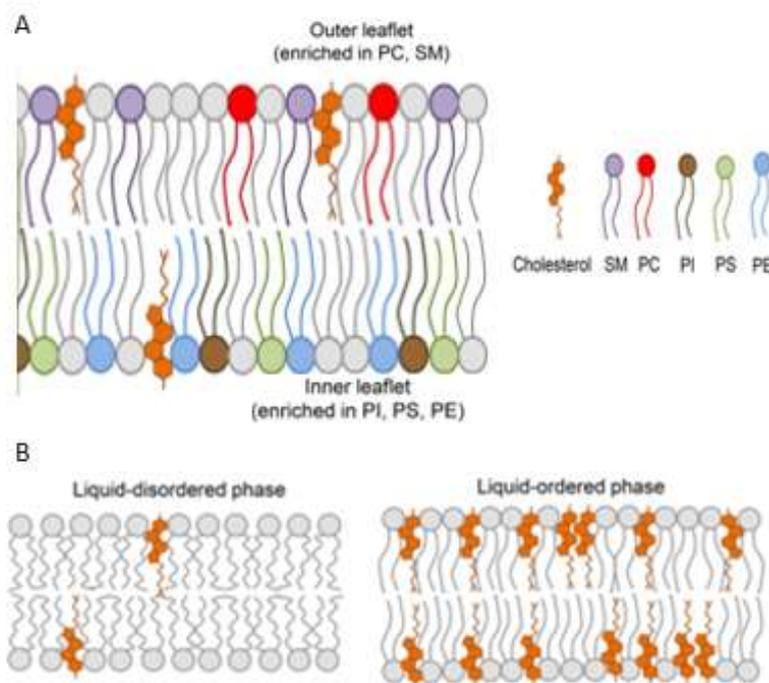


Figure 26 : Organisation de la membrane plasmique d'une cellule animale. (A) La composition du feuillet externe (outer) et le feuillet interne (inner) n'est pas identique et peut fluctuer. (B) La quantité de cholestérol présent au sein de la bicouche peut modifier la rigidité et la perméabilité membranaire. Adapté de Desai & Miller 2018.

Le feuillet interne de la membrane, très riche en PL, contient une grande quantité d'AGPI. Du fait de leur structure, les AGPI favorisent une organisation du feuillet en phase désordonnée ou liquide. A l'inverse, le feuillet externe est riche en sphingolipides composés majoritairement

d'AGS, ce qui favorise l'organisation du feuillet en phase ordonnée ou solide (Desai & Miller, 2018).

Le cholestérol, présent dans les deux feuillets, peut interagir à la fois avec les sphingolipides et les PL. En s'insérant entre les acides gras des PL, le cholestérol peut soit augmenter le degré d'orientation des chaînes carbonées des AG, soit réduire le mouvement de ces chaînes. Il peut ainsi modifier l'organisation des feuillets en les rendant plus ou moins rigides et donc plus ou moins perméables. Le cholestérol contribue aussi à stabiliser la membrane en limitant les interactions et mouvements avec les autres éléments de la membrane (Mouritsen & Zuckermann, 2004; Slotte, 2013).

- Le mouvement des lipides

Les lipides peuvent se déplacer au sein de la membrane soit par rotation, diffusion latérale ou par flip-flop (passage d'un feuillet à l'autre) (**Figure 27**) (Bever *et al.*, 1999; Sharom, 2011; Montigny *et al.*, 2016). L'ensemble de ces mouvements est nécessaire à l'activité cellulaire.

- Les lipides polaires peuvent traverser la bicouche par diffusion spontanée sans dépense d'énergie ou bien se déplacer par mouvement transversal par l'action de plusieurs enzymes.
- Les floppases, ou flippases ABC, catalysent le passage des PL du feuillet interne vers le feuillet externe
- Les flippases assurent le passage des PL dans le sens inverse, du feuillet externe vers le feuillet interne
- Les scramblases sont responsables des mouvements transversaux bidirectionnels des lipides

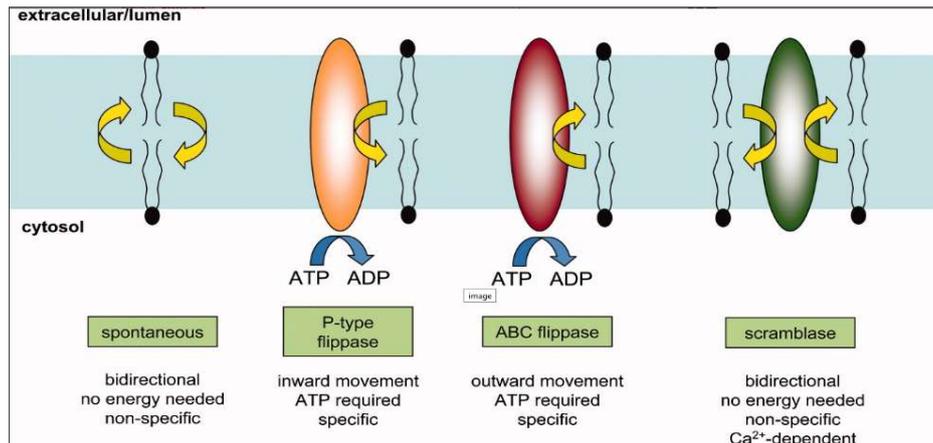


Figure 27 : Mouvements possibles des lipides dans la bicouche. D'après Sharom, 2011

Les floppases et les flippases sont des enzymes ATP dépendantes. Elles jouent un rôle actif dans le maintien de l'asymétrie membranaire. Les scramblases, quant à elles, sont des enzymes calcium-dépendantes et tendent à rétablir la symétrie membranaire de part et d'autre des feuilletts.

De manière intéressante, deux études ont démontré que la flippase dATP8B joue un rôle essentiel dans la réponse des NSO aux odorants chez *Drosophila melanogaster*. Cette enzyme contribuerait à maintenir un environnement lipidique propice au bon fonctionnement des RO (Ha *et al.*, 2014; Liu *et al.*, 2014).

- La fluidité membranaire

Au sein de la membrane, les lipides et les protéines ne sont pas figés et sont animés de mouvement. La fluidité confère à la membrane à la fois souplesse et résistance. Elle est en partie dictée par la force des interactions de Van der Waals entre les lipides qui la composent. Plus la chaîne carbonée est longue, plus les interactions seront importantes et la mobilité moindre.

La fluidité membranaire permet à la cellule d'assurer de nombreuses fonctions comme la communication et le trafic cellulaire. Plusieurs facteurs peuvent l'influencer :

- La composition en AG de la bicouche lipidique : le degré d'insaturation et la conformation structurale des AG influencent la fluidité membranaire.
- La quantité de cholestérol : plus il y a de cholestérol, plus la membrane est rigide.
- Les protéines membranaires : plus il y a de protéines membranaires, plus la fluidité diminue.
- La température : les lipides ont la capacité de changer de phase en fonction de leur température de transition. Dans les modèles d'étude de la bicouche lipidique, plus la température augmente, plus la membrane est fluide.

La fluidité membranaire est fortement dépendante de la composition et de la conformation des chaînes d'acides gras. Les AGS, principalement présent dans les PL du feuillet externe, favorisent la formation d'une membrane de type ordonnée. En phase ordonnée, les interactions entre les chaînes d'acides gras sont fortes et ne facilitent pas les mouvements ce qui provoque une diminution de la fluidité membranaire. Inversement, grâce à leurs propriétés physico-chimiques, les AGMI ou AGPI favorisent la formation d'une membrane de type désordonnée donc plus fluide.

De nombreux mécanismes physiologiques dépendent de la fluidité membranaire comme la transduction de messages, l'écoulement des flux d'électrons au sein membranes.

CHAPITRE 3 : Impact nutritionnel des AGPI n-3

1. Evolution de l'alimentation humaine

Depuis la révolution industrielle, nos modes de vie ont profondément évolué. Les progrès réalisés dans l'agroalimentaire ont révolutionné les modes de production et les hommes vivant dans les pays industrialisés ont modifié en profondeur leur alimentation de base (Cordain *et al.*, 2005; Blasbalg *et al.*, 2011). Les caractères nutritifs des aliments tels qu'on peut les consommer aujourd'hui ont évolué avec l'avènement de l'agriculture moderne et de la production industrielle. L'accès à un très large éventail de produits alimentaires et l'augmentation de la consommation des produits raffinés, comme les céréales, les sucres et les huiles, ont modifié qualitativement et quantitativement les apports énergétiques en protéines, en glucides et en lipides consommés chaque jour par l'homme. Ces modifications rapides à l'échelle de l'évolution humaine n'ont pas permis au génôme humain de s'adapter et ont engendré l'apparition de nombreuses pathologies chroniques comme le diabète, les maladies cardiovasculaires, l'obésité ou encore le syndrome métabolique (Cordain *et al.*, 2005).

Parallèlement, pour répondre aux recommandations des agences de santé publique, la consommation des lipides riches en acides gras saturés (beurre, lard et autres graisses animales) a diminué au profit de la consommation des huiles végétales riches en AGPI n-6 proposées par le secteur de l'agroalimentaire (Gibson *et al.*, 2011). Progressivement, notre alimentation s'est appauvrie en AGPI n-3 et s'est enrichie en AGPI n-6, créant une augmentation du ratio AGPI n-6/n-3. Avant l'avènement de l'agriculture moderne, le ratio AGPI n-6/n-3 était estimé à 1-2 :1. Aujourd'hui, ce ratio est fortement déséquilibré. Il est en moyenne de 20 :1 en France et peut atteindre 40 :1 en Amérique du Nord. Ce déséquilibre nutritionnel en AGPI peut avoir de réelles conséquences sur la santé en favorisant ou en aggravant certains mécanismes impliqués dans des maladies chroniques telles que l'obésité, le diabète, le syndrome métabolique (Cordain *et al.*, 2005).

2. Recommandations nutritionnelles

En 2015, l'agence nationale de la sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (Anses, 2015) a réalisé une vaste étude nationale afin de réévaluer les références nutritionnelles pour les acides gras. Grâce à l'ensemble des données collectées dans la littérature, l'ANSES a choisi d'établir de nouvelles valeurs nutritionnelles pour les lipides en prenant en compte à la fois le besoin physiologique en lipides comme source d'énergie nécessaire pour le bon fonctionnement de l'organisme mais également le besoin nutritionnel optimal dans une démarche de prévention pour certaines pathologies comme l'obésité, le diabète, les maladies cardiovasculaires et métaboliques et le cancer.

Aujourd'hui, l'ANSES recommande de consommer 35-40% de lipides pour couvrir les besoins énergétiques d'un individu en bonne santé consommant 2000 Kcal/jour (**Tableau 3**). Un apport inférieur entraînerait une réduction de l'apport en AGPI. De plus, l'agence préconise désormais de consommer un AGPI de la série n-3 pour 4 AGPI de la série n-6 pour assurer l'apport alimentaire nécessaire de certains AGPI tout en limitant leurs effets délétères sur la santé (Gómez Candela *et al.*, 2011; Anses, 2015). Les AGPI présents dans notre alimentation proviennent à la fois de sources végétales (graines, oléagineux, huiles) et animales (poisson, œuf, viande, volaille).

Tableau 3 : Besoins physiologiques minimaux en AG totaux et en AGPI indispensables chez l'Homme adulte consommant une ration énergétique quotidienne de 2000 Kcal ; AE : apport énergétique. D'après l'ANSES, 2015.

Lipides	Besoin physiologique minimum	Apport nutritionnel conseillé
AG totaux	30% de l'AE	35-40% de l'AE
Acide linoléique (AL)	2.0% de l'AE	4% de l'AE
Acide α-linoléique (ALA)	0.8% de l'AE	1% de l'AE
Acide docosahexanoïque (DHA)	0.1% de l'AE (250 mg/j)	250mg /j

3. Impact nutritionnel des AGPI n-3 sur les fonctions cérébrales

Comme évoqué dans le chapitre 2, les lipides sont des constituants majeurs des cellules du système nerveux et jouent un rôle crucial dans les fonctions cérébrales (Dyall, 2015). Pour mieux comprendre le rôle des AGPI dans les mécanismes physiologiques, de très nombreuses études se sont intéressées non seulement à l'impact de régimes déséquilibrés en AGPI sur le fonctionnement du cerveau au stade adulte mais également aux conséquences d'un tel déséquilibre lors de la période périnatale chez le rongeur et l'Homme.

Au cours de la période périnatale, le cerveau connaît une phase de croissance extraordinaire au cours de laquelle se produisent une maturation rapide des neurones, de la synaptogénèse et le développement de la matière grise. C'est également pendant cette période que le besoin en lipides et plus particulièrement en AGPI-LC (tels que le DHA et l'AA) pour constituer les membranes cellulaires est considérable (Clandinin *et al.*, 1983; Green *et al.*, 1999). La plupart des stratégies expérimentales mises en place pour étudier l'impact nutritionnel des AGPI n-3 sur les fonctions cérébrales a consisté à alimenter les mères avec un régime déficient en AGPI n-3 depuis la conception (voire avant) jusqu'à l'âge adulte pendant une ou plusieurs générations. La littérature est dense et les études se différencient en fonction des déficits instaurés, de la durée des régimes et de l'âge auquel les paramètres étudiés ont été mesurés (in utéro, naissance, sevrage, jeune adulte, ...). Très souvent, l'impact d'un déficit nutritionnel en DHA a été évalué sur les fonctions cognitives de la progéniture à l'aide de tests de comportement. Les mécanismes moléculaires et cellulaires sous-jacents ont été investigués par certaines équipes.

a. Observations comportementales

- Chez les rongeurs

De multiples études se sont intéressées aux effets de ces régimes sur les fonctions cognitives des rongeurs. La plupart des tests ont été réalisés à l'aide de labyrinthes (Plateforme de Morris

et labyrinthe de Barnes) afin d'évaluer l'apprentissage et la mémoire et le bon fonctionnement de l'hippocampe, structure cérébrale impliquée dans ces fonctions.

Si les études de Bourre (1985), Nakashima (1993) et Carrie (2000) ne montrent pas de différence entre les groupes contrôle et les groupes soumis à un régime déficient en AGPI n-3, l'étude d'Enslin (1991) a démontré que l'exploration des rats soumis à régime déficient est diminuée par rapport aux soumis à un régime contrôle (Bourre, 1989; Enslin *et al.*, 1991; Nakashima *et al.*, 1993; Carrié *et al.*, 2000). Les auteurs suggèrent que cette différence entre les groupes pourrait être due à un état émotionnel ou à une modification des perceptions sensorielles des rats soumis à régime déficient en AGPI n-3. Une autre étude a comparé les effets de régimes alimentaires affichant des ratios d'AGPI n-6/ n-3 différents : aucune différence n'a été observée au niveau des fonctions cognitives des rongeurs. (Wainwright *et al.*, 1997).

Les études de Moriguchi et al en 2000 et 2003 ont utilisé un modèle de déficience alimentaire en AGPI n-3 sur 3 générations et ont montré qu'un régime déficient en AGPI n-3 diminue de 80% la teneur cérébrale en DHA dès la première génération (Moriguchi *et al.*, 2000; Moriguchi & Salem, 2003) . Le déficit atteint 87% à la troisième génération. Comme attendu, ce déclin est compensé par une augmentation de la teneur cérébrale des AGPI n-6. Les résultats des tests comportementaux montrent que les rats déficients âgés de 7 semaines, tout en étant plus actifs, mettraient plus de temps pour apprendre et réaliser la tâche par rapport aux contrôles. Selon les auteurs, cette différence serait due à un défaut dans le processus d'habituation dans un nouvel environnement. Une étude complémentaire menée par Carrié et al en 2000 a démontré que des rats ayant été soumis dans un premier temps à un régime appauvri en AGPI n-3 puis dans un deuxième temps supplémenté en AGPI n-3 au moment de la naissance ou du sevrage retrouvent un niveau cérébral de DHA similaire aux contrôles après deux mois de supplémentation et réalisent des scores identiques aux animaux contrôles lors des tests comportementaux. Néanmoins, Lozada et al ont montré que les altérations de la mémoire et de l'apprentissage induites par une déficience nutritionnel en AGPI n-3 depuis la conception jusqu'à l'âge adulte ne sont pas rétablies si la supplémentation en AGPI n-3 s'effectue après le sevrage. Ce résultat suggère qu'il existerait une période précise pour contrecarrer les effets d'un déficit nutritionnel en AGPI n-3 sur les fonctions cognitives (Lozada *et al.*, 2017).

Dans l'étude menée par Greiner et al en 2001, des rats âgés de 9 semaines sous régime déficient depuis 2 générations ont été soumis à 7 tests de discrimination olfactive (Greiner *et al.*, 2001). L'étude montre que la teneur du cerveau en DHA est réduite de 82% dans le groupe déficient

par rapport au groupe contrôle et que les rats déficients sont moins performants dans l'exécution de certains tests de discrimination olfactive par rapport aux rats contrôles. Les auteurs suggèrent que ces résultats pourraient être dûs à un défaut d'attention, de motivation ou lié à un défaut de stratégie pour répondre au test et non pas à un défaut de discrimination des odeurs. Avec un protocole expérimental similaire, Hichami et al ont étudié l'impact d'un régime déficient en AGPI n-3 depuis deux générations sur les fonctions cognitives et olfactives des rats âgés de 8 semaines (Hichami *et al.*, 2007). Les résultats sont en accord avec les précédentes études et montrent que les animaux déficients possèdent 80% de moins de DHA dans le bulbe olfactif, le piriforme cortex et le néocortex par rapport aux animaux contrôles. Cette baisse de DHA est compensée par une augmentation des AGPI n-6. Les résultats des tests indiquent qu'une déficience chronique en AGPI n-3 provoque une altération modérée de l'apprentissage chez les rats mais n'affecterait pas la discrimination olfactive.

Comme le suggèrent plusieurs auteurs, la baisse des performances cognitives rapportées dans ces études de comportement pourraient également s'expliquer par des troubles sensoriels, moteurs ou de l'humeur.

Deux études menées par Belzung (1998) et Carrié (2000) présentent des résultats contradictoires concernant l'état d'anxiété des rongeurs soumis à un régime déficient en AGPI n-3 (Belzung *et al.*, 1998; Carrié *et al.*, 2000). Si la première étude ne montre pas de différence entre les groupes, la deuxième rapporte que le niveau d'anxiété est plus élevé chez les souris déficientes mais également qu'une supplémentation adéquate en AGPI n-3 de 7 semaines diminue le niveau d'anxiété des souris même si celui-ci reste supérieur à celui du groupe contrôle. Ces résultats sont confirmés par une étude plus récente menée par Chen et al où les auteurs démontrent qu'un régime appauvri en AGPI n-3 pendant la gestation et l'allaitement provoque des troubles de l'humeur, en particulier des troubles anxieux et dépressifs chez la progéniture mâle soumise à un régime déficient à l'âge adulte par rapport aux rats contrôles (Chen & Su, 2013).

Chez les rongeurs, un régime déficient en AGPI n-3 débuté au moment de la conception jusqu'au sevrage de la progéniture provoque une baisse très importante de la teneur cérébrale en DHA. Dans certains protocoles expérimentaux, cette diminution s'élève à plus de 80%. L'appauvrissement membranaire en DHA ne touche cependant pas que les cellules du cerveau. Des données indiquent qu'une déficience alimentaire en AGPI n-3 peut également avoir un impact à long terme sur les fonctions visuelles (Guesnet *et al.*, 2005).

Chez les vertébrés, la rétine est le tissu le plus riche en DHA. Un appauvrissement en AGPI n-3 au niveau des membranes des cellules rétinienne a des conséquences sur le fonctionnement du système visuel. Les rats soumis à une déficience chronique en AGPI n-3 depuis la conception présentent des électrorétinogrammes avec de faibles amplitudes, ce qui indique que la rétine détecte moins bien le signal lumineux (Wheeler *et al.*, 1975; Fedorova & Salem, 2006). Dans un autre modèle expérimental comme le primate, les résultats sont similaires. En effet si on supplémente des primates avec des AGPI n-3 pendant plusieurs mois, la teneur en DHA est en partie restaurée dans la rétine et l'acuité visuelle des animaux est partiellement rétablie par rapport aux animaux contrôles (Anderson *et al.*, 2005).

Comme on peut le constater, les résultats de l'ensemble de ces études ne concordent pas toujours. Ces disparités peuvent s'expliquer par le protocole expérimental mis en œuvre. En effet, les paramètres comme la durée du régime, l'âge auquel il est administré, l'état nutritionnel de l'animal, l'amplitude du déficit ou de la supplémentation et enfin les tests proposés aux animaux peuvent être très variés.

- Chez l'Homme

L'impact d'une déficience chronique ou d'une supplémentation en AGPI n-3 pendant la période périnatale et à l'âge adulte a fait l'objet de très nombreuses études chez l'Homme. La littérature est extrêmement dense, c'est pourquoi je citerai ici quelques études réalisées au cours des ces périodes clés.

Lors de la grossesse, le LA, l'ALA, l'AA, l'EPA et le DHA sont transportés jusqu'au fœtus par le placenta. Comparés aux taux plasmatiques maternels, les taux plasmatiques fœtaux de DHA et d'AA sont plutôt élevés, indiquant que leur transport est favorisé par rapport aux LA et ALA. Des études ont montré que chez les mères supplémentées en DHA, les taux plasmatique et fœtal de cet AGPI sont plus élevés que lorsqu'elles sont soumises à une supplémentation en ALA (Guesnet *et al.*, 2018)

En 2014, Gould et al ont publié une importante étude épidémiologique concernant 2400 femmes enceintes ayant reçu 800 mg/jour de DHA au cours de leur grossesse et dont les enfants ont été suivis de la naissance jusqu'à l'âge de 7 ans. Aucun effet de la supplémentation en DHA sur le

développement neuronal à 18 mois et sur les fonctions cognitives générales à 4 ans n'a pu être clairement mis en évidence. Cependant, les auteurs rapportent que les fonctions cognitives des enfants de 4 ans dont les mères ont reçu la supplémentation se sont développées plus précocement (Gould *et al.*, 2014).

Des études canadiennes ont également évalué l'impact de la consommation quotidienne d'AGPI n-6 et AGPI n-3 de femmes enceintes lors du dernier trimestre de la grossesse (Innis, 2003, 2008). Elles ont montré que le ratio plasmatique LA/ALA des futures mères ne consommant pas suffisamment d'ALA était fortement déséquilibré, ne facilitant pas la synthèse de DHA. De plus, l'étude de Mulder et al suggèrent que les enfants dont les mères ont consommé un supplément de type placebo au cours de leur grossesse auraient plus de risque de présenter un retard de maturation des fonctions visuelles à l'âge de 2 mois et un léger retard dans le développement du langage à l'âge de 18 mois comparés aux enfants dont les mères ont reçu une supplémentation de 400mg/jour de DHA (Mulder *et al.*, 2014).

A cours de l'allaitement, un tiers des AGPI détectés dans le lait maternel proviennent des pré-curseurs et des AGPI-LC présents dans l'alimentation. Les deux tiers restants sont fournis par le tissu adipeux. La teneur en LA du lait maternel est fortement dépendante de l'alimentation au cours de la grossesse et pendant l'allaitement. Dans les pays occidentaux, la teneur en LA a fortement augmenté dans le lait maternel. Ces changements sont directement liés aux types de lipides consommés par les mères. En France, le LA et l'ALA représentent respectivement 10% et 0,9% des AG totaux présent dans le lait maternel, aboutissant à un ratio LA/ALA proche de 10

Une étude clinique a montré que les enfants prématurés ou nés à terme bénéficiant d'une alimentation à base de lait industriel enrichi en huile de maïs et dépourvus d'acides gras essentiels de la série n-3 affichaient des scores plus faibles aux tests d'acuité visuelle comparés aux enfants prématurés ou nés à terme nourris au lait maternel enrichis en acides gras essentiels de la série n-3 (Birch *et al.*, 1993).

Plus récemment, plusieurs études ont démontré que le taux plasmatique de DHA des enfants nés à terme et allaités était positivement corrélé avec le développement des facultés visuelles et cognitives de ces enfants (Innis, 2008). Besnard et al en 2017 quant à eux ont montré que la consommation d'un lait maternel à forte teneur en AL et faible teneur en DHA aboutit à une

diminution du quotient intellectuel chez les enfants âgés de 5 à 6 ans (Guesnet *et al.*, 2018) L'ensemble de ces études épidémiologiques et cliniques renforce l'idée selon laquelle la teneur en DHA ainsi que le ratio AL/ALA sont cruciaux pour le développement des fonctions cognitives et visuelles chez l'enfant.

En raison des effets biochimiques et neurochimiques observés dans les modèles animaux de déficience chronique en AGPI n-3, de nombreuses études cliniques ont été réalisées chez des patients souffrant de dépression. Les études ont montré que la teneur plasmatique en AGPI n-3 des patients déprimés est très souvent diminuée tandis que celle des AGPI n-6 ne l'est jamais. Ce faible taux d'AGPI n-3 pourrait être un facteur de risque dans la mise en place de troubles de l'humeur comme la dépression. La supplémentation en EPA améliorerait les symptômes tandis que la supplémentation en DHA ne semble pas avoir d'effets (Bazinet & Layé, 2014; Larrieu & Layé, 2018).

Dans des situations de stress intense, les sujets bénéficiant d'une supplémentation en DHA présentent de meilleures performances cognitives impliquant des fonctions non cognitives comme l'attention et les émotions. Ces sujets ont un état psychologique plus stable (diminution de la colère, de la fatigue, de l'anxiété et des symptômes dépressifs) (Yehuda *et al.*, 2005). Chez l'Homme, le stress psychologique entraîne notamment la production de cytokines inflammatoires. Une supplémentation en DHA grâce à ses propriétés anti-inflammatoires pourrait à la fois influencer la réponse physiologique puis cognitive induite par une situation de stress chronique (Simopoulos, 2010).

Les comportements agressifs et impulsifs ont également été étudiés. Comme précédemment les données collectées démontrent qu'une alimentation déficiente en AGPI n-3 modifie à la fois la teneur plasmatique ou sanguine des AGPI n-3 et/ou n-6 et que ces modifications peuvent être corrélées à divers troubles psychopathologiques (dépression, phobie, trouble bipolaire, schizophrénie) (Larrieu & Layé, 2018).

Plusieurs mécanismes ont été proposés pour tenter d'expliquer les liens entre une déficience en AGPI n-3 et la mise en place des troubles psychopathologiques. En plus des altérations neurochimiques décrites dans les modèles animaux, d'autres dysfonctionnements pourraient interve-

nir lors de la conversion des AGPI-LC et lors de l'incorporation des AGPI dans les PL membranaires, ou bien résulter des modifications des propriétés physico-chimiques des membranes ou de l'expression de certains gènes impliqués dans les fonctions cérébrales.

De très nombreuses études épidémiologiques et cliniques se sont intéressées à l'impact d'une supplémentation en AGPI n-3 sur les fonctions cognitives altérées par la maladie d'Alzheimer. La majorité des résultats indique que les taux sanguins d'EPA et de DHA sont abaissés de 30 à 50 % chez les sujets malades comparés à des sujets contrôles du même âge. Plusieurs études indiquent qu'une supplémentation en huile de poisson riche en DHA diminue le risque d'un déclin cognitif chez les individus malades ou âgés (Kalmijn *et al.*, 1997; Morris *et al.*, 2003). Ces études montrent que contrairement aux données obtenues dans les cas de dépression, seule la supplémentation en DHA induirait des mécanismes neuroprotecteurs qui pourraient empêcher ou retarder le développement de la maladie d'Alzheimer. Par contre, ces résultats sont plus mitigés chez les individus jeunes chez qui la supplémentation en DHA et EPA n'améliorent pas la mémoire. Les études réalisées *in vitro* et chez l'animal ont démontré que la supplémentation en AGPI n-3 favorise la plasticité synaptique en améliorant la potentialisation à long terme (LTP), mécanisme de base impliqué dans la mémoire et l'apprentissage. De plus, la supplémentation en AGPI n-3 augmente également les quantités d'EPA et de DHA dans les membranes des cellules cérébrales. L'augmentation de la teneur cérébrale en AGPI n-3 ayant des propriétés anti-inflammatoires contribue à diminuer l'inflammation cérébrale décrite dans la maladie d'Alzheimer ou lors des accidents vasculaires cérébraux (Hooper *et al.*, 2018)

b. Mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués

Le DHA est l'AGPI-LC de la série n-3 le plus abondant dans les membranes cellulaires du cerveau. Pour tenter d'élucider les liens entre les AGPI-LC et les altérations comportementales observées en cas de déficience ou supplémentation nutritionnelle, de nombreux travaux se sont intéressés aux mécanismes cellulaires et moléculaires sous-jacents dans des modèles *in vitro* et *in vivo*.

- Modulation de la synthèse de neurotransmetteurs et d'hormones

Des effets neurochimiques ont été observés chez les rats soumis à une déficience chronique en AGPI n-3, en particulier au niveau du système glutamatergique et cholinergique (Zimmer, Delion-Vancassel, *et al.*, 2000; Zimmer, Delpal, *et al.*, 2000; Aïd *et al.*, 2003). Ces études ont montré d'une part que les rats déficients affichaient un taux basal de dopamine plus élevé au niveau du noyau acumbens ou plus d'acétylcholine au niveau de l'hippocampe que les rats contrôles et d'autre part, que le stockage de ces neurotransmetteurs était perturbé. En 2004, Kodas *et al.* ont montré qu'un régime déficient en AGPI n-3 altère également la transmission synaptique de la sérotonine en augmentant à la fois sa libération tout en diminuant son stockage dans l'hippocampe de rat (Kodas *et al.*, 2004). Parfois, ces troubles s'accompagnent aussi de modifications de paramètres physiologiques comme une augmentation du taux plasmatique de corticostérone et du rythme cardiaque (Chen & Su, 2013). L'ensemble de ces études indique qu'une déficience chronique en AGPI n-3 peut altérer la libération et le stockage de différents neurotransmetteurs. Ces perturbations sont susceptibles de modifier les fonctions du système nerveux central comme l'apprentissage, la mémoire, l'attention et les émotions ainsi que certains paramètres physiologiques.

- Modulation de la neurogénèse et de la synaptogénèse

Au cours de la période périnatale, les régimes déficients en AGPI n-3 peuvent également perturber la neurogénèse et la synaptogénèse comme cela a été démontré par plusieurs études. Cette période où la croissance neuronale est très importante s'accompagne d'une accumulation d'AGPI-LC, et en particulier de DHA, dans les membranes cellulaires du cerveau du fœtus puis du nouveau-né. Un déficit nutritionnel en DHA à ce stade du développement peut avoir des effets délétères comme une diminution de la neurogenese et la plasticité synaptique (Di Miceli *et al.*, 2020)

Kawakita *et al.* ont montré *in vitro* que le DHA favorise la différenciation des cellules souches neurales issues d'embryons de rats pour promouvoir la formation de neurones matures (Kawakita *et al.*, 2006). Parallèlement, ces auteurs ont montré qu'un régime enrichi en DHA augmente

la neurogénèse dans la couche de cellules granulaires du gyrus denté chez des rats adultes. En 2013, Tang et al ont démontré qu'un régime déficient en AGPI n-3 administré pendant la gestation perturbe la neurogénèse et le métabolisme de plusieurs neurotransmetteurs (glutaminoergique et sérotoninergique) dans le cerveau de rats femelles à la naissance (Tang *et al.*, 2016).

D'autres études réalisées *in vitro* ont mis en évidence qu'en présence de DHA, des neurones issus de l'hippocampe de rat présentent un nombre accru de synapses par rapport à des neurones cultivés dans des conditions « contrôles », démontrant ainsi le rôle DHA dans la croissance des neurites et la synaptogénèse (Cao *et al.*, 2009; Kim *et al.*, 2011). Par ailleurs, il a été montré que l'EPA favorise davantage la myélinisation des axones que le DHA. L'EPA stimule l'expression de protéines de la myéline dans le système nerveux central des nouveaux-nés de rats (Salvati *et al.*, 2008).

- Modulation de la plasticité synaptique

La plasticité synaptique correspond à l'ensemble des mécanismes à l'origine des modifications morphologiques et/ou fonctionnelles au niveau des synapses. Des études ont montré que les AGPI n-3 module la plasticité synaptique. En effet, Cao et al ont démontré que l'administration d'un régime déficient en AGPI n-3 pendant le développement entraîne une diminution de la synapsine (une protéine localisée à la surface des vésicules synaptiques et impliquée dans la synaptogénèse et la libération des neurotransmetteurs) et des sous-unités NR2A et NR2B du récepteur NMDA dans l'hippocampe de rats âgés de 18 jours entraînant une altération de la LTP connue pour jouer un rôle dans l'acquisition de la mémoire et dans l'apprentissage (Cao *et al.*, 2009).

- Modulation de la transcription des gènes

L'analyse des ARNm de cerveau de rat adulte par la technique de « microarrays » a permis de démontrer qu'un régime enrichi en ALA ou en EPA+DHA module l'expression de gènes autres que ceux impliqués dans le métabolisme lipidique (Kitajka *et al.*, 2004) Ces régimes augmen-

tent également le niveau d'expression de plusieurs gènes impliqués dans la production d'énergie (tels que certains éléments des ATP synthases ou du cytochrome C) et dans la transduction du signal (calmodulines) ainsi que certains gènes codant pour des protéines du cytosquelette. Une déficience chronique en AGPI n-3 chez le rat provoque une diminution de l'expression de certains gènes comme le transporteur du glucose Glut1 ou le gène précoce c-fos, marqueur de l'activité neuronale dans le cerveau (Hichami *et al.*, 2007).

- Modulation de l'inflammation

Depuis plusieurs décennies, le nombre de personnes touchées par des maladies chroniques comme l'obésité, le diabète de type 2 ou le syndrome métabolique s'est considérablement accru dans le monde. Bien que ces pathologies aient des origines multifactorielles, de nombreuses études ont montré qu'une alimentation trop riche en graisses et en sucres contribue aux processus inflammatoires souvent observés de manière chronique chez ces patients.

Les AGPI présents dans les membranes cellulaires sont capables de réguler l'inflammation. Certains acteurs impliqués dans la réponse inflammatoire et dans la résolution de l'inflammation sont des médiateurs lipidiques synthétisés à partir des AGPI n-6 et n-3 (**Figure 28**).

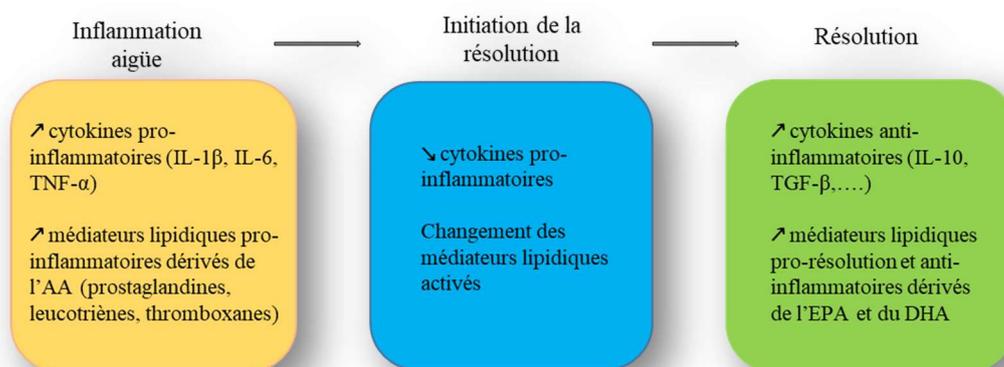


Figure 28 : Evènements impliqués dans la réponse inflammatoire et sa résolution. Adapté de Joffre *et al.*, 2019.

L'AA présent en position sn-2 des PL et Pls membranaires peut être libéré grâce à l'action de la PLA2 et servir de précurseur à la synthèse de médiateurs lipidiques tels que les eicosanoïdes impliqués dans la réponse inflammatoire. De manière similaire, l'EPA et le DHA peuvent également être libérés et servir respectivement de précurseurs à la synthèse des résolvines de la série E et des résolvines de la série D, des marésines et des protectines impliqués dans la résolution de l'inflammation. Ces différents médiateurs lipidiques sont synthétisés via des voies métaboliques impliquant les COX, LOX, et CYP450 (Calder, 2015).

Compte tenu de la forte teneur en AGPI-LC dans le cerveau, de très nombreux travaux ont été menés pour étudier l'impact des régimes alimentaires déficient ou enrichi en AGPI-LC de la série n-3 sur les mécanismes de l'inflammation dans divers modèles.

Une étude menée par Madore *et al.*, a montré qu'un apport nutritionnel déficient en AGPI n-3 au cours de la période périnatale chez la souris provoque une augmentation de l'expression des cytokines pro-inflammatoires, une altération du phénotype des cellules microgliales et de la plasticité à long terme dans l'hippocampe en conditions physiologiques (Madore *et al.*, 2014).

Des études nutritionnelles s'intéressant aux effets de la supplémentation ont majoritairement été menées en injectant à des rongeurs du lipopolysaccharide (LPS) ou de l'IL1 β par voie intraventriculo-cérébrale pour provoquer une réaction inflammatoire. Le LPS est une endotoxine constituant la majorité de la paroi cellulaire des bactéries Gram $^-$. L'inflammation induite par le LPS provoque la libération de cytokines et de chémokines pro-inflammatoires.

Les études ont montré que l'administration d'un régime enrichi en AGPI-LC de la série n-3 confère une protection contre l'inflammation dans l'hippocampe en inhibant la production de cytokines pro-inflammatoires qui fait suite à l'injection de LPS chez les rongeurs adultes (Rey *et al.*, 2019). D'autres études ont montré que suite à une injection de LPS, un régime enrichi en AGPI n-3 inhibe la synthèse d'IL-1 β , d'IL-6 et de TNF- α , augmente la synthèse d'IL-10 et d'IL-4 dans l'hippocampe et diminue l'activation de protéines connues pour leur rôle dans l'inflammation comme c-Jun, JNK et NF κ B (Kavanagh *et al.*, 2004; Lonergan *et al.*, 2004; Shi *et al.*, 2017). Dans un modèle expérimental différent, des rats adultes soumis à un régime enrichi en EPA et ayant subi une injection intracérébrale d'IL-1 β présentent, par rapport à des animaux contrôles, un niveau d'activation des cellules microgliales et des astrocytes plus faible, une augmentation d'IL-10 dans l'hippocampe et une diminution des troubles du comportement

(comme l'anxiété) et de la mémoire spatiale (Song *et al.*, 2008, 2008; Dong *et al.*, 2018). Une autre étude menée par Sierra *et al.* a montré qu'une supplémentation en EPA et non en DHA augmentait la production d'IL-10 dans les lymphocytes et les macrophages issus de la moelle osseuse de souris (Sierra *et al.*, 2008).

Il est intéressant de noter que l'EPA peut aussi être un précurseur pour la synthèse d'eicosanoïdes. Toutefois des travaux ont montré que les eicosanoïdes synthétisés à partir d'EPA avaient des propriétés pro-inflammatoires moins puissantes que l'AA (Calder, 2015).

Enfin, d'autres études ont montré que la consommation d'huile de poisson enrichie en AGPI-LC n-3 augmente la teneur sanguine en résolvines chez l'homme (Mas *et al.*, 2012). Rey *et al.*, ont montré chez la souris que la supplémentation en AGPI-LC n-3 module à la fois le profil des médiateurs lipidiques et le niveau d'expression des cytokines pro-inflammatoires dans l'hippocampe de souris après une injection de LPS (Rey *et al.*, 2019).

Les AGPI peuvent moduler la réponse inflammatoire via plusieurs mécanismes complexes. Comme évoqué plus haut, les AGPI-LC sont des précurseurs des médiateurs lipidiques ayant soit des propriétés pro ou anti-inflammatoires. Ils peuvent aussi réguler l'expression de gènes en se fixant à des facteurs de transcription impliqués dans de nombreuses voies de signalisation (Calder, 2015).

L'EPA et le DHA contribuent à la résolution de la réponse inflammatoire. En effet, à l'état libre, ils peuvent se lier directement à des facteurs de transcription comme les PPAR et NFκB. Lorsque l'EPA et le DHA activent les PPAR, le complexe nouvellement formé va se lier à la sous unité p65 du facteur de transcription NFκB et de ce fait inhiber la transcription des gènes codant pour les cytokines pro-inflammatoires comme IL-1β, IL-6 et TNFα ainsi que les enzymes comme COX-2 impliquées dans la synthèse des médiateurs lipidiques.

L'EPA et le DHA ont également la faculté d'interagir directement avec NFκB. Il a été montré que le DHA en se liant à NFκB empêche la dégradation de la sous unité IκB et par conséquent la translocation dans le noyau du facteur de transcription, ce qui bloquerait la transcription de gènes codant pour des protéines pro-inflammatoires.

PARTIE 2

Problématique & *Stratégie expérimentale*

Problématique

Depuis la révolution industrielle, nos modes de vie ont profondément évolué. Suite aux progrès réalisés dans le domaine de l'agroalimentaire, les habitants des pays industrialisés ont modifié leur alimentation de base et consomment aujourd'hui beaucoup d'aliments transformés (Cordain *et al.*, 2005). Si ces produits semblent alléchants à force de marketing intelligemment ciblé, il n'en demeure pas moins qu'au fond de nos assiettes, leurs propriétés nutritionnelles ne sont pas toujours en accord avec nos besoins physiologiques.

Les lipides sont des nutriments indispensables au bon fonctionnement de l'organisme. Ils sont utilisés à la fois comme source d'énergie et comme source d'AG nécessaires au maintien de l'homéostasie cellulaire. En effet, les précurseurs des AGPI n-6 et n-3 (LA et ALA, respectivement) ainsi que leurs dérivés à longue chaîne (AA, EPA et DHA) peuvent influencer de manière cruciale diverses fonctions biologiques comme les fonctions cérébrales, en particulier au cours du développement (Guesnet *et al.*, 2018).

Avant l'avènement de l'agriculture moderne, le ratio AGPI n-6: n-3 était estimé à 1-2 :1. Aujourd'hui ce ratio est fortement déséquilibré. Il est en moyenne de 20:1 en France et peut atteindre 40:1 en Amérique du Nord. En se basant sur la littérature accumulée pendant vingt ans, l'ANSES recommande aujourd'hui de maintenir ce ratio autour de 4:1 (Gómez Candela *et al.*, 2011; Anses, 2015).

De nombreux travaux ont démontré qu'il existe des liens entre l'alimentation et l'apparition de maladies métaboliques (obésité, diabète, hypercholestérolémie, syndrome métabolique, ...). Du fait de leurs rôles au niveau de la membrane cellulaire, comme précurseurs métaboliques ou comme régulateurs de l'expression génique, des apports déséquilibrés en AGPI peuvent contribuer à la mise ou place ou à l'aggravation de mécanismes délétères.

Des études menées chez l'Homme ont révélé que certains individus souffrant d'obésité présentent des facultés olfactives altérées (Obrebowski *et al.*, 2000; Richardson *et al.*, 2004). Ces troubles pourraient avoir des conséquences néfastes sur le comportement alimentaire de ces patients. Les mécanismes physiologiques à l'origine de ces dysfonctionnements olfactifs ne sont pas connus. Une des hypothèses proposées est qu'un déséquilibre nutritionnel, notamment en lipides, perturberait le fonctionnement du système olfactif périphérique.

A ce jour, peu de travaux ont exploré l'impact des lipides sur la physiologie de la MO. Une étude menée par Thiébaud et al. en 2014 a montré qu'un régime hyper-lipidique perturbe les capacités olfactives des souris et affecte l'anatomie et la fonctionnalité du système olfactif périphérique (Thiébaud *et al.*, 2014). Deux autres études ont également montré qu'un régime alimentaire normo-lipidique déficient en AGPI n-3 altère les capacités olfactives de rats mais les mécanismes sous-jacents n'ont pas été mis en évidence (Greiner *et al.*, 2001; Hichami *et al.*, 2007).

La composition de la MO de rongeur en AGPI présente des similitudes avec celle d'autres tissus neuronaux comme le cerveau et la rétine, en affichant notamment une forte teneur en AGPI n-3 (Le Bon *et al.*, 2018). Cette observation suggère que les AGPI n-3 pourraient exercer des fonctions essentielles au sein de la MO. Si tel est le cas, un régime déséquilibré en AGPI n-3 pourrait conduire à un dysfonctionnement du système olfactif périphérique.

Ce projet de thèse a donc pour objectif d'évaluer l'impact de régimes déséquilibrés en AGPI n-3 sur la composition lipidique et la fonctionnalité du système olfactif périphérique de la souris.

Pour cela, une approche nutritionnelle visant à exposer des souris à un régime déficient ou supplémenté en AGPI n-3 depuis la gestation a été mise en œuvre. Nous avons choisi de soumettre les souris à ces régimes tout au long du développement et jusqu'à l'âge adulte car on sait aujourd'hui qu'une alimentation maternelle déséquilibrée au cours des périodes allant de la conception jusqu'à la lactation peut influencer le développement et la santé de la descendance chez les mammifères (Marangoni *et al.*, 2016). En effet, il a été montré qu'une alimentation maternelle riche en sucres et en graisses ainsi que le diabète maternel et l'obésité maternelle peuvent induire, en autres, l'apparition de troubles métaboliques chez la descendance à plus ou moins long terme (Williams *et al.*, 2014; Rando & Simmons, 2015).

Par ailleurs, il a été montré qu'une alimentation maternelle adéquate en AGPI n-3, et plus particulièrement en DHA, au cours de la vie embryonnaire et post natale est indispensable à la croissance et au développement du cerveau et de la rétine chez la descendance. De nombreuses études ont en effet démontré qu'un régime déficient en AGPI n-3 est délétère pour le développement et le fonctionnement du système nerveux central. Toutefois, les études portant sur la supplémentation en AGPI n-3 sont plus modérées : elles mettent en évidence soit peu d'effets soit l'absence de bénéfice. Pourtant, dans le cas de pathologies ou de maladies mettant en jeu

des mécanismes inflammatoires, la supplémentation en AGPI n-3 peut assurer un rôle protecteur.

Afin d'approfondir les connaissances sur le rôle des AGPI n-3 sur le fonctionnement du système olfactif périphérique. Nous avons donc choisi d'étudier les effets de régimes déficient ou enrichi en AGPI n-3 en condition physiologique normale.

Stratégie expérimentale

1. Modèle nutritionnel

Les trois régimes utilisés ont été fabriqués par l'Unité Expérimentale Sciences de l'Animal et de l'Aliment du centre INRAE de Jouy-en-Josas. Ils se présentent sous la forme de granulés dont la composition est basée sur la formulation AIN-G93 conçue pour les rongeurs en période de croissance (Reeves *et al.*, 1993). Ils contiennent 5% de lipides. Les mélanges d'huiles incorporés dans les régimes ont été préparés par nos soins à partir d'huiles de palme, de colza, de tournesol, d'oléisol et de poisson (**Tableau 4**).

Tableau 4 : Sources de lipides utilisées dans les régimes expérimentaux

Huiles	CON	LOW	HIGH
Tournesol (%)	13	23	16
Oléisol (%)	27	52	27
Palme (%)	20	25	5
Colza (%)	40		39
Poisson (%)			13

Le régime contrôle (CON) est un régime équilibré en AGPI n-3 et n-6 (*Tableau 5*). Le régime déficient en AGPI n-3 (LOW) contient un faible taux d'acide alpha-linolénique (ALA ; 18 :3n-3). Le régime enrichi en AGPI n-3 se caractérise par une forte teneur en AGPI n-3 à longues chaînes. Les trois régimes contiennent un taux adéquat d'acide linoléique (18:2n-6).

Tableau 5 : Composition en AG des régimes.

Acides Gras (% des AG totaux)	CON	LOW	HIGH
12:0	0.15	0.15	0.14
14:0	0.53	0.60	1.32
15:0			0.12
16:0	13.32	16.00	9.44
16:1n-9			0.10
16:1n-7	0.20	0.17	1.19
17:0			0.14
18:0	4.62	4.65	4.31
18:1 t	3.85	3.39	3.22
18:1n-9	54.32	55.81	51.74
18:1n-7	2.09	0.99	2.32
18:2n-6	16.49	16.91	17.62
20:0	0.40	0.28	0.45
20:1n-9	0.52	0.17	0.66
18:3n-3	2.84	0.15	3.03
22:0	0.43	0.58	0.50
22:1n-9	0.11		0.13
20:4n-6			0.14
24:0	0.16	0.21	0.15
20:5n-3			1.97
24:1n-9			0.10
22:5n-3			0.19
22:6n-3			1.08
AGS	19.59	22.44	16.55
AGMI	61.08	60.52	59.43
AGPI	19.33	17.05	24.03
Somme des AGPI n-6	16.49	16.91	17.76
Somme des AGPI n-3	2.84	0.15	6.27
Ratio AGPI n-6/n-3	5.80	116.73	2.83

Les régimes ont été administrés *ad libitum* à des souris C57BL/6 femelles (âgées de 11 semaines au moment de la mise en couple) pendant les périodes de gestation et de lactation puis à leur progéniture jusqu'à l'âge de 8 semaines (**Figure 29**).

Afin d'évaluer les effets des régimes sur le fonctionnement du système olfactif périphérique au cours du développement, des tests de comportement olfactif et des prélèvements de tissus ont été effectués sur la descendance F1 mâle âgée de 3 semaines (animaux juste sevrés) et 8 semaines (jeunes adultes).

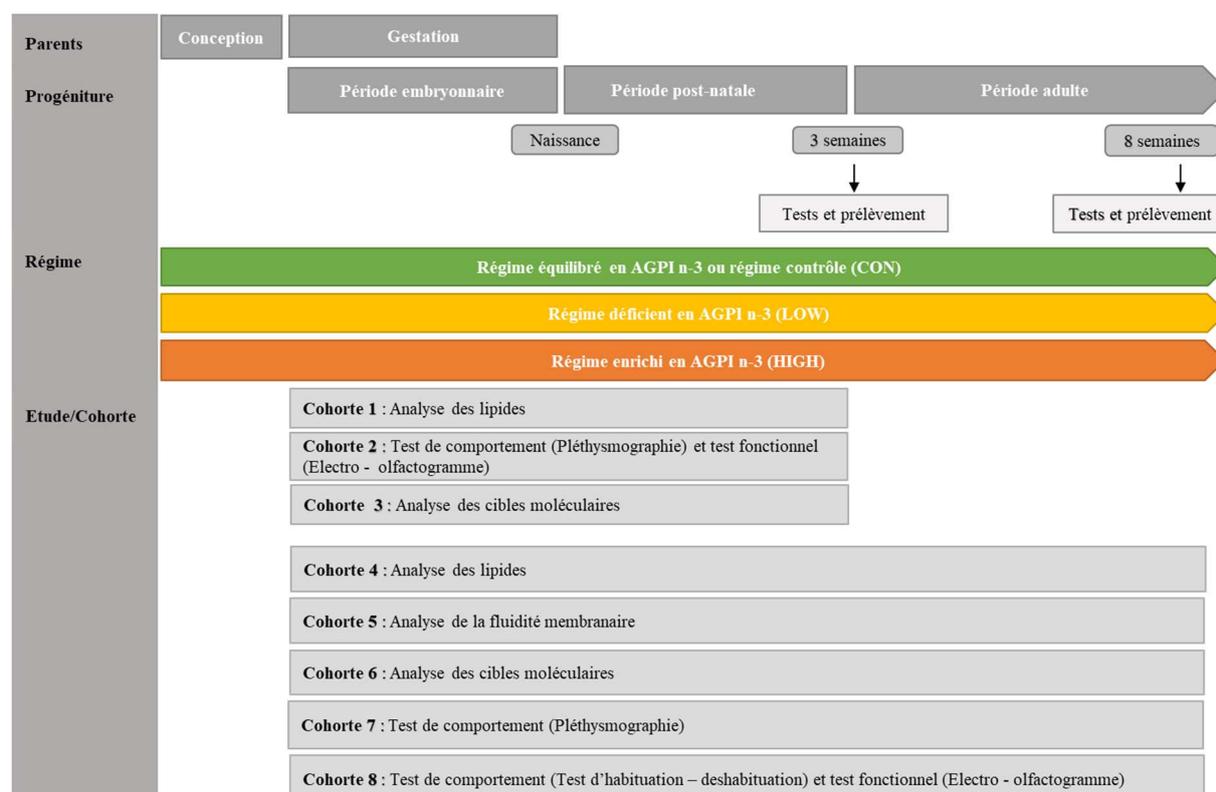


Figure 29 : Protocole expérimental mis en œuvre

2. Etudes réalisées

Ce modèle nutritionnel a été mis en œuvre dans le but d'étudier, chez les souris F1 âgées de 3 et 8 semaines, les conséquences des régimes déficient ou enrichi en AGPI n-3 sur :

a. La composition en AG du tissu olfactif périphérique (MO)

Nous avons analysé le profil des AG totaux de MO prélevées chez la progéniture mâle âgée de 3 et 8 semaines.

Les principaux acteurs impliqués dans la détection et la transduction du signal olfactif étant localisés dans les cils olfactifs qui émanent des NSO, nous avons également analysé le profil des AG de ce compartiment cellulaire chez les souris F1 âgées de 8 semaines.

Les PL constituent le groupe de lipides majoritaire dans la MO. Une caractérisation approfondie des espèces moléculaires de PL de la MO a été effectuée chez les souris F1 âgés de 8 semaines.

Afin d'exploiter au mieux les animaux produits au cours de ces études, des analyses d'AG totaux et d'espèces moléculaires de PL ont également été réalisées sur les MO des souris F1 femelles âgées de 3 semaines. Les données obtenues ont été comparées à celles récoltées chez les mâles afin d'évaluer si le sexe a un impact sur la composition en AG de la MO.

b. La fluidité des membranes de cils olfactifs

Il est aujourd'hui bien établi que la structure des AG estérifiés dans les PL membranaires influence les propriétés des membranes, et en particulier leur degré de fluidité. Nous avons tenté d'évaluer l'impact des régimes sur la fluidité des membranes ciliaires. Ces analyses ont été réalisées sur des cils olfactifs provenant de souris âgées de 8 semaines.

c. La neurogénèse et la maturation des NSO

Au cours du développement et tout au long de la vie, la MO est un lieu de neurogénèse intense où cohabitent à la fois des NSO matures et immatures. Du fait de cette particularité, nous nous sommes intéressés à ce processus en analysant par QPCR l'expression de certains marqueurs de neurogénèse et de maturation des NSO.

d. Certaines fonctions cellulaires

Diverses cibles moléculaires impliquées dans l'homéostasie cellulaire, l'inflammation et le métabolisme des lipides ont également été étudiées par QPCR.

e. La fonctionnalité de la MO

Nous avons mis en œuvre une approche fonctionnelle qui consiste à enregistrer *ex-vivo* l'activité électrophysiologique de la MO lorsqu'elle est stimulée par un odorant. Des analyses par QPCR de l'expression d'acteurs impliqués dans la transduction du signal olfactif ont été effectuées en complément de cette approche.

f. La perception olfactive des souris

Enfin, nous avons évalué les capacités olfactives des souris en mettant en œuvre des tests de comportement olfactif au moment du sevrage et à l'âge adulte.

Les résultats de ces différentes études sont présentés ci-après:

- 1) effets observés à l'âge de 3 semaines ;
- 2) effets observés à l'âge de 8 semaines.

PARTIE 3

Résultats

ETUDE n°1

*Impacts des régimes maternels déséquilibrés
en AGPI -3 sur la physiologie du système olfactif péri-
phérique de la progéniture au moment du sevrage*

1. Impact de régimes maternels déséquilibrés en AGPI n-3 sur la composition lipidique de la muqueuse olfactive des souriceaux

a. Progéniture femelle : Article Khoury *et al.*, 2020

Dans cette étude, nous avons évalué les répercussions d'une alimentation maternelle déficiente ou enrichie en AGPI n-3 sur la composition en acides gras (AG) des tissus olfactifs (MO et BO) de souriceaux femelles âgés de 3 semaines. Les AG des tissus olfactifs des mères et du lait maternel ont également été analysés.

Les régimes ont été administrés *ad libitum* aux mères depuis la conception jusqu'au sevrage de leur progéniture. La composition en AG des régimes est décrite dans la **Table 1** de l'article.

Les AG totaux ont été analysés par chromatographie gazeuse couplée à un détecteur à ionisation de flamme. L'analyse structurale des phospholipides (PL) des tissus olfactifs des souriceaux a été réalisée par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse.

L'analyse des laits maternels indique que le profil d'AG du lait reflète globalement la composition des régimes maternels (**Table 2**). Par rapport au lait des mères du groupe CON, le lait du groupe LOW est fortement appauvri en AGPI n-3 (- 73%) tandis que le lait du groupe HIGH est enrichi en AGPI n-3 (+83%). Cependant, il est intéressant de noter que le lait du groupe LOW contient de faibles quantités d'AGPI n-3 malgré un apport alimentaire maternel quasi nul. Ces AGPI n-3 pourraient résulter de la mobilisation des AGPI stockés dans le tissu adipeux et le foie des mères et/ou d'une synthèse au niveau de la glande mammaire.

L'analyse des AG présents dans les tissus olfactifs (MO et BO) des mères montre que le régime LOW entraîne une augmentation (+ 22% dans la MO, + 10% dans les BO) de la teneur en AGPI n-6 (notamment de l'acide arachidonique (AA ; 22 :4n-6) et de l'acide docosapentaénoïque n-6 (DPA n-6 ; 22:5n-6) (**Table 3**). A l'inverse, le régime HIGH induit une augmentation de la teneur en AGPI n-3 (+ 18% dans la MO, +15% dans les BO) et une diminution des AGPI n-6.

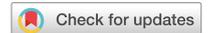
En ce qui concerne la progéniture femelle au moment du sevrage, nos résultats indiquent que les régimes LOW et HIGH modifient significativement la distribution des AG dans la MO par rapport au groupe CON (**Table 4**). En effet, ces deux régimes entraînent une diminution de la teneur en AG saturés (en particulier de l'acide palmitique) et une augmentation de la teneur en AGPI totaux. Comme observé dans le tissu olfactif maternel, le régime LOW provoque une importante augmentation de la teneur en AGPI n-6 (+ 73%, notamment de l'AA et du DPA n-6) et une diminution de la teneur en AGPI n-3 (- 40%, notamment du DHA). Le régime HIGH induit une forte augmentation de la teneur en AGPI n-3 (+ 88%, en particulier de l'acide eicosapentaénoïque (EPA), du DPA n-3 et du DHA) tandis que la teneur en AGPI n-6 n'est pas affectée. Des effets similaires sont observés dans les BO.

L'analyse des classes de PL de la MO et des BO indique que les régimes LOW et HIGH n'ont aucun impact sur les proportions relatives de ces classes de lipides (**Figure 1**). En revanche, ces régimes modulent de manière importante la teneur des AG incorporés dans les phosphatidylcholines (PC) et les phosphatidyléthanolamines (PE) (**Figures 2 et 3**). En effet, le régime LOW entraîne une diminution des espèces moléculaires contenant des AGPI n-3 et une augmentation des espèces moléculaires contenant des AGPI n-6 dans ces 2 classes de PL. Le régime HIGH induit des effets opposés dans ces mêmes classes de PL.

Cette étude démontre que les régimes déséquilibrés en AGPI n-3 administrés pendant la période périnatale modifient la composition en AG des tissus olfactifs des mères ainsi que celle des tissus olfactifs de la progéniture. Les MO et BO des souriceaux du groupe déficient en AGPI n-3 contiennent un fort taux d'AGPI n-6 et une teneur réduite en AGPI n-3. A l'inverse, le régime enrichi en AGPI n-3 diminue la teneur en AGPI n-6 et augmente le taux d'AGPI n-3 dans ces tissus. Les modifications concernent principalement les AGPI à longues chaînes, et plus particulièrement l'AA, le 22:4n-6 et le DPA n-6 dans la série n-6, l'EPA, le DPA n-3 et le DHA dans la série n-3. La teneur plus élevée de plusieurs AGPI à longues chaînes de la série n-6 dans les tissus olfactifs du groupe LOW est en accord avec les données de la littérature. En effet, il a été montré que dans le cerveau et la rétine de rongeurs adultes, le DPA n-6 tend à remplacer le DHA lorsque celui-ci est présent en quantité insuffisante. Le DPA n-6 est considéré comme l'homologue métabolique du DHA mais il ne possède pas les mêmes propriétés biologiques. Cependant, chez les jeunes rongeurs, d'autres AGPI à longues chaînes de la série n-6 tels que l'AA et le 22:4n-6 contribuent aussi à remplacer le DHA dans le cerveau et la

rétine. Nos résultats indiquent que ce processus de remplacement du DHA par plusieurs AGPI n-6 se produit également dans les tissus olfactifs pendant la période périnatale.

Au cours de cette étude, nous avons également mis en évidence qu'une alimentation maternelle déficiente ou enrichie en AGPI de la série n-3 modifie la composition moléculaire des PC et des PE, deux importantes classes de PL. Les sous-classes de plasmalogènes (PlsC et PlsE) sont également affectées par ces régimes. Les AGPI incorporés dans ces PL jouent un rôle structural et biologique essentiel, notamment comme réservoir de seconds messagers et médiateurs lipidiques. Les modifications observées pourraient de ce fait avoir des conséquences physiologiques. En effet, l'importance d'un apport adéquat en AGPI n-3 pendant la période cruciale du développement est aujourd'hui reconnue. Chez les rongeurs, un taux anormalement bas en DHA dans le cerveau au cours de cette période conduit à des déficits cognitifs, une altération de la neurotransmission et un risque accru de développer des troubles anxio-dépressifs.



OPEN

Perinatal exposure to diets with different n-6:n-3 fatty acid ratios affects olfactory tissue fatty acid composition

Spiro Khoury, Vanessa Soubeyre, Stéphanie Cabaret, Laetitia Merle, Stéphane Grégoire, Nicolas Deprêtre, David Jarriault, Xavier Grosmaître, Lionel Bretilon, Olivier Berdeaux, Niyazi Acar & Anne Marie Le Bon

The olfactory mucosa (OM) and the olfactory bulb (OB) are responsible for the detection and processing of olfactory signals. Like the brain and retina, they contain high levels of n-3 and n-6 polyunsaturated fatty acids (PUFAs), which are essential for the structure and function of neuronal and non-neuronal cells. Since the influence of the maternal diet on olfactory lipid profiles of the offspring has been poorly explored, we examined the effects of feeding mice during the perinatal period with diets containing an adequate linoleic acid level but either deficient in α -linolenic acid (ALA) or supplemented in n-3 long-chain PUFAs on the lipid composition of dams and weaning offspring olfactory tissues. In both the OM and OB, the low n-3 ALA diet led to a marked reduction in n-3 PUFAs with a concomitant increase in n-6 PUFAs, whereas consumption of the high n-3 PUFA diet reduced n-6 PUFAs and increased n-3 PUFAs. Structural analysis showed that the molecular species profiles of the main phospholipid classes of olfactory tissues from weaning pups were markedly affected by the maternal diets. This study demonstrates that the PUFA status of olfactory tissues is sensitive to diet composition from the early stages of development.

Polyunsaturated fatty acids (PUFAs) are essential for the structure and functioning of neuronal and non-neuronal cells found in nervous tissues such as the brain and retina. They are particularly involved in neuronal survival, neurogenesis, synaptic function and regulation of inflammation¹⁻³. PUFAs are found in different lipid species, mainly in membrane phospholipids (PLs). The most abundant PUFAs in the mammalian brain and retina are docosahexaenoic acid (DHA, C22:6n-3), an n-3 PUFA, and arachidonic acid (AA, C20:4n-6), an n-6 PUFA⁴⁻⁶. DHA is the major long-chain derivative of the precursor of the n-3 PUFAs, α -linolenic acid (ALA, C18:3n-3), whereas AA is formed from the precursor of the n-6 series, linoleic acid (LA, C18:2n-6). Despite the endogenous capacity of humans to synthesize n-3 PUFAs from their precursor, the rate of conversion is considered to be too low to significantly participate in the tissue levels of n-3 PUFAs⁷, and therefore, humans rely on adequate dietary intake.

Most PUFAs rapidly accumulate in the brain and retina during the later stages of gestation and early postnatal life via placental transfer and maternal milk. The incorporation of PUFAs in the cell membranes during the perinatal period contributes to the functional maturation of nervous tissues. Animal studies have provided evidence for the importance of maternal PUFA intake for the neurological development of offspring. Hence, a dietary supply of n-3 PUFAs during pregnancy and lactation promotes cognitive development, while an n-3 PUFA deficit impairs it⁸⁻¹². Similarly, the perinatal dependence of the retina on the n-3 PUFA supply has been demonstrated for several decades⁹. A deficiency in retinal DHA subsequent to dietary restriction of n-3 PUFAs during gestation and early postnatal life alters the fine-tuning of visual topography in rodents¹³ as well as molecular events involved in visual transduction^{14,15}.

In mammals, the olfactory system consists of a variety of specialized neurons that are found in the olfactory mucosa (OM), the olfactory bulb (OB), and other higher order olfactory centres, such as the piriform cortex and the orbitofrontal cortex¹⁶. The OM is located in the upper region of the nasal cavity. It comprises the olfactory

Centre des Sciences du Goût et de l'Alimentation, AgroSup Dijon, CNRS, INRAE, Université Bourgogne Franche-Comté, 21000 Dijon, France. email: anne-marie.le-bon@inrae.fr

epithelium, which is composed of multiple cell types, including olfactory sensory neurons (OSNs), and the underlying lamina propria. The dendrites of OSNs project toward the mucus layer covering the olfactory epithelium, where they protrude cilia containing odourant receptors. Binding of odourant molecules to receptors triggers a signal transduction cascade that leads to the generation of action potentials that are then conveyed to the OB. The OB is the first brain region in which odour information is processed. At this level, olfactory signals are processed by interneurons (mainly by periglomerular cells and granular cells) before being exported to higher centres of the brain by output neurons (mitral cells and tufted cells).

The lipid composition of the mammalian OM and OB shares common features with that of the brain and retina. We have shown that rodent OM contains a high proportion of PUFAs, with n-3 and n-6 PUFAs accounting for 13% and 23% of total fatty acids (FAs), respectively¹⁷. N-3 and n-6 PUFAs are found at similar levels in rat OB (20% and 16%, respectively)¹⁸. DHA and AA are the major n-3 and n-6 PUFAs identified in both tissues. These PUFAs are found in different PL groups, mainly in phosphatidylcholine (PC), phosphatidylethanolamine (PE), phosphatidylinositol (PI) and phosphatidylserine (PS)^{17,18}.

Little is known about the impact of PUFAs present in the diet on the PUFA content of olfactory tissues. Dietary depletion of n-3 PUFAs during the prenatal and postnatal periods for 2 generations was reported to decrease PS accumulation¹⁹ and to significantly increase the C22:5n-6 level in the rat OB¹⁸. On the other hand, ALA or ALA plus DHA supplementation from conception until postnatal day 70 resulted in a significant enhancement of DHA levels in the OB²⁰. Altogether, these findings suggest that the PUFA composition of the mammalian OB can be affected by the maternal diet during development. As far as the OM is concerned, to our knowledge, the influence of PUFA dietary intake on the composition of this tissue has not yet been assessed.

The present study aimed to assess the effects of feeding diets with different n-6:n-3 PUFA ratios to mice during the perinatal period on the lipid composition of olfactory tissues from dams and their offspring. To this end, we analysed the FA composition of the dam and pup OM and OB at weaning as well as that of dam milk. In addition, we characterized the molecular species in each PL class (including plasmalogens) extracted from the OM and OB of 3-week-old pups.

Results

Dam tissues. *Fatty acid composition of maternal milk.* Maternal milk was collected 15 days after the pups were born (P15). At this time, dams were fed with the experimental diets (CON, LOW or HIGH diets; Table 1) for 5 weeks. There was no significant difference in the total lipid content of milk between the CON, LOW and HIGH groups ($16.9 \pm 1.1\%$, $17.7 \pm 2.4\%$, and $17.2 \pm 0.80\%$, respectively). Compared to the CON group, milk from the LOW dams contained significantly less n-3 PUFAs (-73%) (Table 2). Although the total n-6 PUFA content was not modified compared to that of CON, a small but significant increase in C20:4n-6 and C22:4n-6 was observed in milk from the LOW group. Hence, the n-6:n-3 ratio in the LOW milk was higher than that in the CON milk ($23.15 \pm 5.08\%$ versus $5.89 \pm 0.07\%$, respectively). In contrast, the n-6:n-3 ratio of the HIGH milk was significantly reduced compared to the CON group ($3.41 \pm 0.10\%$ versus $5.89 \pm 0.07\%$, respectively). This effect was due to the strong increase in n-3 PUFAs (C20:5n-3; C22:5n-3; and C22:6n-3) compared to CON milk. The milk n-6 PUFA content was not altered by the maternal HIGH diet. As a marker of essential PUFA deficiency²¹, Mead acid (C20:3n-9) was significantly increased by $+33\%$ in LOW milk and decreased by half in HIGH milk compared to CON milk.

Fatty acid composition of the maternal olfactory mucosa and olfactory bulb. The FA profiles of maternal OM and OB were analysed at the end of the lactation period, i.e., in dams fed with the experimental diets for 6 weeks. OM from the LOW dams had significantly higher total n-6 PUFA levels (C20:4n-6, C22:4n-6, and C22:5n-6; $+22\%$) and lower total n-3 FA levels (-20%) than the dams of the CON group (Table 3). In contrast, the OM of dams fed the HIGH diet showed increased n-3 PUFA levels ($+18\%$) and reduced n-6 PUFA levels (-12%) compared to the CON group. There was no difference among the 3 groups in the levels of saturated FAs (SFAs), monounsaturated FAs (MUFAs), PUFAs and dimethyl acetals (DMAs), which are residues of plasmalogens. In the OB of dams, the consumption of the LOW diet also resulted in a significant decrease in n-3 PUFAs (-15%) and in a modest but significant increase in n-6 PUFAs ($+10\%$), whereas the HIGH diet enhanced the n-3 PUFA level ($+15\%$) and reduced the n-6 PUFA level (-10%) in the OB of dams. In addition, the level of C18:1n-9 was significantly decreased in the OB of the LOW group and enhanced in the HIGH group. Similar to the OM, the levels of SFAs, MUFAs, PUFAs and DMAs in the OB were not affected by the diets.

Offspring tissues. Lipid composition of olfactory mucosa. Fatty acid composition of total lipids. Compared to the CON group, the LOW diet significantly affected the levels of SFAs (-22%), PUFAs ($+33\%$) and DMAs (-8%) in offspring OM (Table 4). The n-6 PUFA proportion was strongly enhanced ($+73\%$), whereas the n-3 PUFA level was reduced by 40%. LOW offspring OM contained significantly higher C20:4n-6 and C22:5n-6. In contrast, lower C16:0 and C22:6n-3 levels were observed in the LOW group. The HIGH diet also modified the FA composition of offspring OM, which was found to contain higher PUFA ($+33\%$) and lower SFA (-22%) levels than the CON group. The n-3 PUFA level was strongly enhanced ($+88\%$), but the n-6 PUFA level was not affected. The OM of the HIGH offspring had significantly higher C20:5n-3, C22:5n-3 and C22:6n-3 than the CON group. Conversely, the levels of C16:0 and C24:1n-9 were significantly reduced. Compared to the CON group, the n-6:n-3 ratio was significantly enhanced (3 \times) in the LOW group, whereas this parameter was reduced by a factor of 1.8 in the HIGH group.

Fatty acids	Experimental diets		
	CON	LOW	HIGH
12:0	0.15	0.15	0.14
14:0	0.53	0.60	1.32
15:0			0.12
16:0	13.32	16.00	9.44
16:1n-9			0.10
16:1n-7	0.20	0.17	1.19
17:0			0.14
18:0	4.62	4.65	4.31
18:1 t	3.85	3.39	3.22
18:1n-9	54.32	55.81	51.74
18:1n-7	2.09	0.99	2.32
18:2n-6 (LA)	16.49	16.91	17.62
20:0	0.40	0.28	0.45
20:1n-9	0.52	0.17	0.66
18:3n-3 (ALA)	2.84	0.15	3.03
22:0	0.43	0.58	0.50
22:1n-9	0.11		0.13
20:4n-6			0.14
24:0	0.16	0.21	0.15
20:5n-3 (EPA)			1.97
24:1n-9			0.10
22:5n-3 (DPA n-3)			0.19
22:6n-3 (DHA)			1.08
SFAs	19.59	22.44	16.55
MUFAs	61.08	60.52	59.43
PUFAs	19.33	17.05	24.03
Total n-6 PUFAs	16.49	16.91	17.76
Total n-3 PUFAs	2.84	0.15	6.27
n-6:n-3 PUFA ratio	5.80	116.73	2.83

Table 1. Fatty acid composition of the experimental diets (% of total fatty acids). *CON* control diet, *LOW* low n-3 diet, *HIGH* high n-3 diet, *ALA* α -linolenic acid, *DHA* docosahexaenoic acid, *DPA* docosapentaenoic acid, *EPA* eicosapentaenoic acid, *LA* linoleic acid, *MUFAs* monounsaturated fatty acids, *PUFAs* polyunsaturated fatty acids, *SFAs* saturated fatty acids.

Phospholipid classes and molecular species. Analysis of PL classes by HPLC-Corona-CAD showed that PC is the most abundant PL class in offspring OM and that the PL profile is not affected by the experimental diets (Fig. 1).

The influence of diets on the molecular species profile of each PL class was then studied in offspring OM. For this purpose, structural analyses by mass spectrometry were performed to identify the esterified FA moieties in each PL class. Figure 2 shows heat maps based on the PL molecular species detected in offspring OM from each of the different dietary groups. The raw data are available in Supplementary Tables S1–S6. The heat map of PC species (Fig. 2A) clearly shows that the LOW and HIGH diets induced opposite effects. Compared to the CON group, an increase in n-6 PUFA-containing species and a decrease in n-3 PUFA-containing species were observed in the PC class from the LOW group, whereas greater amounts of n-3 PUFA-containing species and lower amounts of n-6 PUFA-containing species were detected in the HIGH group. The experimental diets did not modify the levels of the main molecular species found in PC (PC 16:0/18:1 and PC 16:0/16:0). The heat map of PE and plasmemyl-ethanolamine (PlsE) species detected in offspring OM (Fig. 2B) shows that the concentrations of various PE + PlsE species were strongly modified by the experimental diets. The pattern observed in this PL class is similar to that identified in the PC class. The LOW diet led to significant increases in numerous n-6 PUFA-containing species and significant decreases in n-3 PUFA-containing species in the PE/PlsE class. Conversely, high amounts of n-3 PUFA-containing species and reduced amounts of n-6 PUFA-containing species were detected in the HIGH group. Regarding the PI class, substantial modifications were induced by the LOW diet (Fig. 2C). This diet provoked a significant increase in PI 18:0/20:4 and PI 18:0/22:5 as well as a decrease in PI 16:0/22:6 and PI 18:0/22:6. The HIGH diet moderately changed the PI molecular composition: only the percentage of PI 18:0/20:4 was significantly reduced by this diet. Similarly, the LOW diet was found to affect the concentrations of a few PS species (increase in PS 16:0/22:5 and decrease in PS 18:0/22:6) (Fig. 2D), while the HIGH diet did not induce a significant change in PS molecular species. Finally, analysis of sphingomyelin (SM) species indicated that the LOW diet significantly decreased the percentage of SM d18:1/24:0 and/or SM

Fatty acids	Maternal milk		
	CON	LOW	HIGH
10:0	7.24 ± 0.29	7.38 ± 1.05	7.72 ± 0.41
12:0	12.64 ± 0.45	13.09 ± 1.84	13.23 ± 0.51
14:0	16.30 ± 0.55	16.68 ± 2.29	17.07 ± 0.49
14:1	0.15 ± 0.02	0.16 ± 0.02	0.18 ± 0.01
15:0	0.08 ± 0.01	0.08 ± 0.01	0.10* ± 0.01
16:0	27.28 ± 0.64	27.71 ± 3.77	26.50 ± 1.11
16:1n-9	0.25 ± 0.01	0.28 ± 0.04	0.20 ± 0.02
16:1n-7	1.61 ± 0.10	1.59 ± 0.24	1.97* ± 0.09
18:0	2.37 ± 0.15	2.49 ± 0.34	2.03 ± 0.11
18:1 t	0.48 ± 0.03	0.52 ± 0.07	0.49 ± 0.03
18:1n-9	22.08 ± 0.87	21.47 ± 3.08	20.41 ± 0.98
18:1n-7	2.15 ± 0.15	1.99 ± 0.31	2.01 ± 0.10
18:2n-6	4.34 ± 0.10	3.88 ± 0.59	4.74 ± 0.20
20:0	0.07 ± 0.01	0.07 ± 0.01	0.07 ± 0.01
20:1n-9	0.92 ± 0.09	1.01 ± 0.15	0.67 ± 0.07
18:3n-3	0.59 ± 0.02	0.09* ± 0.13	0.61 ± 0.03
20:2n-6	0.37 ± 0.03	0.40 ± 0.06	0.36 ± 0.03
20:3n-9	0.09 ± 0.01	0.12* ± 0.02	0.05* ± 0.01
20:3n-6	0.25 ± 0.01	0.28 ± 0.04	0.23 ± 0.02
22:1n-9	0.07 ± 0.01	0.09 ± 0.01	0.06 ± 0.01
20:4n-6	0.21 ± 0.02	0.31* ± 0.04	0.18 ± 0.02
20:5n-3	0.09 ± 0.01	0.07 ± 0.01	0.27* ± 0.02
24:1n-9	0.08 ± 0.01	0.08 ± 0.01	0.07 ± 0.01
22:4n-6	0.09 ± 0.01	0.14* ± 0.02	0.06 ± 0.01
22:5n-3	0.09 ± 0.01	0.02* ± 0.02	0.30* ± 0.01
22:6n-3	0.12 ± 0.01	0.06* ± 0.02	0.44* ± 0.02
SFAs	65.98 ± 1.23	67.50 ± 9.19	66.71 ± 1.44
MUFAs	27.79 ± 1.08	27.16 ± 3.89	26.06 ± 1.17
PUFAs	6.24 ± 0.16	5.36* ± 0.85	7.24* ± 0.28
Total n-6 PUFAs	5.26 ± 0.14	5.01 ± 0.72	5.56 ± 0.24
Total n-3 PUFAs	0.89 ± 0.02	0.24* ± 0.18	1.63* ± 0.06
n-6:n-3 ratio	5.89 ± 0.07	23.15* ± 5.08	3.41* ± 0.10

Table 2. Fatty acid composition of maternal milk samples (% of total fatty acids). Data *are* expressed as the mean ± S.E.M. (n = 4–6 mice/group). *MUFAs* monounsaturated fatty acids, *PUFAs* polyunsaturated fatty acids, *SFAs* saturated fatty acids. *Values are significantly different from the CON group (Mann–Whitney U test, $p < 0.05$).

d18:0/24:1 and/or SM d16:0/26:1 as well as SM d18:0/26:2 (Fig. 2E). Neither diet influenced the levels of lysophosphatidylcholine (LPC) molecular species (Fig. 2F).

Lipid composition of the olfactory bulb. Fatty acid composition of total lipids. When compared to the CON group, the percentage of n-6 PUFAs was greatly enhanced in the OB from offspring fed the LOW diet (+ 55%) (Table 4). A substantial increase in C22:5n-6 and C20:4n-6 occurred. In contrast, a strong decrease in n-3 PUFAs was observed (– 43%). C22:5n-3 and C22:6n-3 were markedly decreased. The HIGH diet led to a significant increase in n-3 PUFAs (+ 18%), whereas a decrease in n-6 PUFAs (– 9%) was observed. The main modifications included a decrease in C22:5n-6 and increases in C20:5n-3, C22:5n-3 and C22:6n-3.

Phospholipid classes and molecular species. Analysis of the OB lipid extracts by LC-Corona showed that PC and PE are the most abundant PL classes in this matrix. The experimental diets did not modify the PL profile of the offspring OB (Fig. 1).

Regarding the composition of PL molecular species, the heat maps presented in Fig. 3 show striking similarities between the effects observed in the OB and those noticed in the OM (Fig. 2). In the PC and PE/PlsE classes of the offspring OB (Fig. 3A, B), the LOW diet induced an increase in various n-6 PUFA-containing species and provoked a decrease in n-3 PUFA-containing species. In contrast, the HIGH diet significantly enhanced the levels of several n-3 PUFA-containing species and reduced the levels of n-6 PUFA-containing species. It is noteworthy that, as observed in the OM, the levels of the main molecular species detected in the OB PC (PC 16:0/18:1 and

Fatty acids	Dam olfactory mucosa			Dam olfactory bulb		
	CON	LOW	HIGH	CON	LOW	HIGH
14:0	0.13±0.02	0.14±0.04	0.10±0.01	0.09±0.01	0.12±0.02	0.12*±0.02
15:0	0.04±0.01	0.04±0.01	0.03±0.01	0.03±0.01	0.04*±0.01	0.04±0.01
dma16:0	4.13±0.11	3.79±0.12	3.60±0.22	3.24±0.15	3.31±0.26	3.63±0.09
16:0	18.32±0.73	17.30±0.49	15.76±0.83	22.51±0.70	24.55*±0.69	22.04±0.69
16:1n-9	0.30±0.02	0.31±0.03	0.26±0.02	0.17±0.01	0.20±0.02	0.20±0.01
16:1n-7	0.71±0.08	1.18±0.49	0.70±0.05	0.52±0.02	0.56±0.06	0.69*±0.05
17:0	0.08±0.01	0.08±0.01	0.09±0.01	0.10±0.01	0.11±0.01	0.10±0.01
dma18:0	1.22±0.04	1.23±0.08	1.45±0.16	2.60±0.11	2.33±0.03	2.44±0.10
dma18:1n-9	0.61±0.01	0.61±0.05	0.73±0.11	0.88±0.07	0.74±0.08	0.88±0.05
dma18:1n-7	0.38±0.01	0.39±0.03	0.49±0.11	1.09±0.09	0.91±0.12	1.06±0.09
18:0	19.22±0.24	18.68±0.30	19.33±0.31	20.10±0.92	20.60±1.37	18.33±0.19
18:1t	0.05±0.01	0.05±0.01	0.05±0.01	0.05±0.01	0.14±0.04	0.05±0.01
18:1n-9	12.99±0.39	13.53±0.50	14.04±0.60	14.51±0.34	13.41*±0.53	15.25*±0.08
18:1n-7	2.76±0.04	3.00±0.17	2.71±0.08	3.78±0.27	3.64±0.35	4.16±0.05
18:2n-6	2.37±0.07	2.21±0.10	2.75±0.20	0.41±0.02	0.29±0.04	0.55*±0.05
20:0	0.17±0.01	0.17±0.01	0.25±0.07	0.21±0.02	0.20±0.01	0.21±0.01
18:3n-6	0.07±0.01	0.06±0.01	0.06±0.01	0.02±0.01	0.04*±0.01	0.03±0.01
20:1n-9	0.31±0.04	0.36±0.07	0.66±0.38	0.92±0.03	0.86±0.05	0.80*±0.03
18:3n-3	0.11±0.01	0.09±0.01	0.21±0.10	0.23±0.01	0.23±0.01	0.21±0.01
20:2n-6	0.12±0.01	0.12±0.01	0.14±0.01	0.08±0.01	0.09±0.01	0.15*±0.04
20:3n-9	0.78±0.02	0.80±0.04	0.71±0.02	0.21±0.01	0.22±0.01	0.21±0.01
22:0	0.13±0.01	0.13±0.01	0.20±0.04	0.15±0.03	0.17±0.02	0.15±0.01
20:3n-6	1.10±0.02	1.12±0.05	1.16±0.06	0.38±0.02	0.25*±0.02	0.50*±0.01
22:1n-9	0.52±0.05	0.40*±0.02	0.56±0.07	0.18±0.05	0.08±0.01	0.09±0.01
20:4n-6	13.89±0.48	16.72*±0.54	11.62*±0.34	9.56±0.21	9.95±0.10	8.59*±0.21
20:5n-3	1.16±0.04	0.52*±0.02	2.52*±0.13	0.11±0.01	0.07*±0.01	0.28*±0.04
24:0	0.21±0.01	0.21±0.02	0.37*±0.07	0.30±0.09	0.34±0.07	0.21±0.01
24:1n-9	0.18±0.01	0.19±0.01	0.26±0.05	0.49±0.10	0.54±0.04	0.57±0.05
22:4n-6	0.91±0.05	1.33*±0.06	0.73*±0.08	2.00±0.05	2.18*±0.05	1.55*±0.05
22:5n-6	0.42±0.02	1.50*±0.07	0.16*±0.01	0.36±0.03	1.30*±0.12	0.15*±0.01
22:5n-3	0.54±0.02	0.36*±0.01	1.01*±0.08	0.14±0.01	0.07*±0.01	0.33*±0.01
22:6n-3	16.02±0.80	13.40*±0.53	17.30±0.86	14.57±0.60	12.46*±0.49	16.48*±0.42
SFAs	38.31±0.87	36.74±0.36	36.14±0.71	43.49±1.74	46.13±1.99	41.18±0.59
MUFAs	17.83±0.57	19.03±1.15	19.25±1.17	20.63±0.56	19.42±0.91	21.79±0.08
PUFAs	37.51±1.33	38.21±0.97	38.35±0.97	28.07±0.89	27.15±0.67	29.04±0.59
DMAs	6.34±0.09	6.02±0.18	6.27±0.30	7.80±0.34	7.29±0.44	8.00±0.15
Total n-6 PUFAs	18.88±0.57	23.05*±0.68	16.61*±0.49	12.80±0.30	14.11*±0.28	11.52*±0.24
Total n-3 PUFAs	17.84±0.84	14.36*±0.54	21.03*±0.79	15.06±0.62	12.83*±0.50	17.31*±0.42
n-6:n-3 ratio	1.07±0.04	1.62*±0.06	0.80*±0.04	0.85±0.02	1.11*±0.04	0.67*±0.01

Table 3. Fatty acid composition of the dam olfactory mucosa and olfactory bulb (% of total fatty acids). Data are expressed as the mean ± S.E.M. (n = 6–7 mice/group). SFAs saturated fatty acids, MUFAs monounsaturated fatty acids, PUFAs polyunsaturated fatty acids, DMAs dimethyl acetals. *Values are significantly different from the CON group (Mann–Whitney U test, p < 0.05).

PC 16:0/16:0) were not affected by the experimental diets. The LOW diet induced some significant changes in the PI and PS classes (Fig. 3C, D). A decrease in species containing C22:6n-3 as well as an increase in species containing C22:5n-6 were observed in this group. The HIGH diet did not appreciably modify the molecular profiles of PI and PS. Lastly, a small number of modifications were induced by the HIGH diet in the SM class (decrease in SM d15:0/23:1 and SM d18:1/24:1) (Fig. 3E) and by the LOW diet in the LPC class (increase in LPC 18:0 and decrease in LPC 22:6) (Fig. 3F).

Discussion

Given the low rate of conversion of ALA into n-3 long-chain PUFAs⁷, consuming n-3 long-chain PUFAs has been widely recommended^{22–24}. Moreover, the worldwide diversity of dietary intakes of n-3 FAs influences the tissue composition of n-3 long-chain PUFAs. Indeed, considerable variability in the circulating levels of n-3 PUFAs has been reported across countries²⁵. The highest amounts were reported in countries and regions known to have the

Fatty acids	Offspring olfactory mucosa			Offspring olfactory bulb		
	CON	LOW	HIGH	CON	LOW	HIGH
14:0	0.49±0.07	0.12*±0.02	0.08*±0.02	0.12±0.02	0.12±0.02	0.07*±0.01
15:0	0.11±0.01	0.06*±0.01	0.06*±0.01	0.03±0.01	0.03±0.01	0.04±0.01
dma16:0	3.60±0.14	3.02*±0.07	3.10*±0.12	3.01±0.05	3.03±0.08	2.79±0.09
16:0	22.63±0.48	14.05*±0.46	14.55*±0.51	18.94±0.73	18.68±0.71	17.40±0.57
16:1n-9	0.42±0.02	0.27*±0.01	0.25*±0.01	0.31±0.01	0.34±0.02	0.26*±0.01
16:1n-7	0.68±0.07	0.37*±0.01	0.43*±0.02	0.46±0.02	0.45±0.02	0.42±0.02
17:0	0.13±0.01	0.11*±0.01	0.11*±0.01	0.10±0.00	0.09±0.01	0.09±0.01
dma18:0	1.17±0.11	1.25±0.02	1.27±0.03	2.51±0.04	2.31*±0.04	2.52±0.04
dma18:1n-9	0.70±0.06	0.71±0.01	0.73±0.04	0.78±0.02	0.78±0.01	0.72±0.03
dma18:1n-7	0.33±0.01	0.36±0.01	0.34±0.01	0.49±0.01	0.51±0.01	0.45±0.02
18:0	18.32±0.98	18.42±0.39	18.07±0.61	19.23±0.18	18.47*±0.22	19.26±0.82
18:1t	0.09±0.04	0.06±0.00	0.04*±0.01	0.07±0.01	0.07±0.01	0.08±0.02
18:1n-9	12.72±0.26	12.33±0.21	12.30±0.34	13.72±0.10	13.26*±0.07	13.72±0.26
18:1n-7	2.76±0.24	2.99±0.06	2.87±0.09	3.53±0.05	3.70*±0.03	3.30±0.18
18:2n-6	4.26±0.40	3.61±0.14	4.54±0.22	0.82±0.01	0.74*±0.02	0.79±0.04
20:0	0.29±0.03	0.20*±0.01	0.18*±0.01	0.21±0.01	0.18*±0.01	0.22±0.01
18:3n-6	0.12±0.01	0.09*±0.01	0.11±0.01	0.04±0.01	0.05*±0.01	0.04±0.01
20:1n-9	0.48±0.06	0.68±0.12	0.52±0.06	0.60±0.01	0.54*±0.01	0.65±0.04
18:3n-3	0.16±0.01	0.11*±0.01	0.14±0.01	0.17±0.01	0.15*±0.01	0.19±0.02
20:2n-6	0.33±0.04	0.42±0.02	0.34±0.01	0.22±0.04	0.27±0.01	0.23±0.03
20:3n-9	0.37±0.06	0.54*±0.07	0.31±0.01	0.21±0.01	0.23±0.03	0.23*±0.01
22:0	0.36±0.06	0.15*±0.01	0.16*±0.01	0.11±0.01	0.08*±0.01	0.14±0.02
20:3n-6	1.42±0.04	1.68*±0.07	1.82*±0.05	0.56±0.01	0.38*±0.01	0.71*±0.01
22:1n-9	1.47±0.14	1.78±0.08	1.96±0.31	1.00±0.16	0.96±0.04	1.53±0.54
20:4n-6	12.81±0.37	21.17*±0.38	13.28±0.23	12.12±0.23	13.99*±0.22	11.22*±0.07
20:5n-3	0.54±0.03	0.19*±0.01	1.89*±0.09	0.15±0.01	0.11*±0.01	0.25*±0.01
24:0	0.56±0.15	0.18*±0.01	0.26*±0.02	0.13±0.03	0.08*±0.01	0.22±0.09
24:1n-9	0.70±0.08	0.29*±0.02	0.29*±0.01	0.11±0.01	0.09*±0.01	0.18*±0.02
22:4n-6	1.17±0.04	2.75*±0.05	1.02*±0.03	2.44±0.07	3.42*±0.09	2.01*±0.04
22:5n-6	0.45±0.03	5.94*±0.19	0.20*±0.01	0.79±0.06	7.36*±0.29	0.21*±0.02
22:5n-3	0.55±0.02	0.20*±0.01	1.18*±0.04	0.24±0.01	0.09*±0.00	0.42*±0.02
22:6n-3	9.84±0.67	5.93*±0.29	17.61*±1.09	16.83±0.36	9.48*±0.17	19.70*±0.69
SFAs	42.88±0.96	33.28*±0.86	33.46*±0.71	38.86±0.83	37.73±0.55	37.44±1.18
MUFAs	19.32±0.51	18.76±0.37	18.65±0.56	19.79±0.17	19.39±0.05	20.12±0.44
PUFAs	32.01±1.13	42.62*±0.89	42.44*±1.24	34.57±0.70	36.25±0.58	35.98±0.75
DMAs	5.80±0.13	5.34*±0.07	5.44±0.17	6.79±0.06	6.63±0.07	6.47±0.13
Total n-6 PUFAs	20.56±0.60	35.66*±0.70	21.31±0.18	16.98±0.36	26.20*±0.57	15.21*±0.09
Total n-3 PUFAs	11.08±0.69	6.42*±0.30	20.82*±1.16	17.38±0.37	9.83*±0.17	20.54*±0.73
n-6:n-3 ratio	1.88±0.08	5.60*±0.23	1.04*±0.06	0.98±0.01	2.67*±0.08	0.74*±0.02

Table 4. Fatty acid composition of the offspring olfactory mucosa and olfactory bulb (% of total fatty acids). Data are the mean ± S.E.M. (n = 6 mice/group). SFAs saturated fatty acids, MUFAs monounsaturated fatty acids, PUFAs polyunsaturated fatty acids, DMAs dimethyl acetals. *Values are significantly different from the CON group (Mann–Whitney U test, p < 0.05).

highest n-3 dietary consumption: Greenland, Japan, Korea and Scandinavia. In contrast, low n-3 PUFA levels were recorded in countries such as the USA and Canada with a low n-3 intake that is characteristic of so-called Western diets, suggesting n-3 deficiency in those populations. Low dietary intake of n-3 PUFAs could increase the risk of adverse health outcomes.

In the present study, our objective was to investigate the effect of feeding pregnant and lactating mice diets containing adequate LA content (1.83% of energy²⁶) but either deficient in ALA or supplemented in n-3 long-chain-PUFAs on FA profiles in the dam's milk and in olfactory tissues of dams and weaning pups. Our results revealed that perinatal consumption of these diets elicited significant changes in the total FA profiles and PL composition of the offspring OM and OB.

In adult rodent OM, PC and, to a lesser extent, PE are the main PL classes^{17,27}. Plasmalogen derivatives of these two classes, PlsC and PlsE, were also detected in this tissue¹⁷. The analyses performed in weaning mice OM gave data that are consistent with these observations and indicated that the experimental diets did not modify

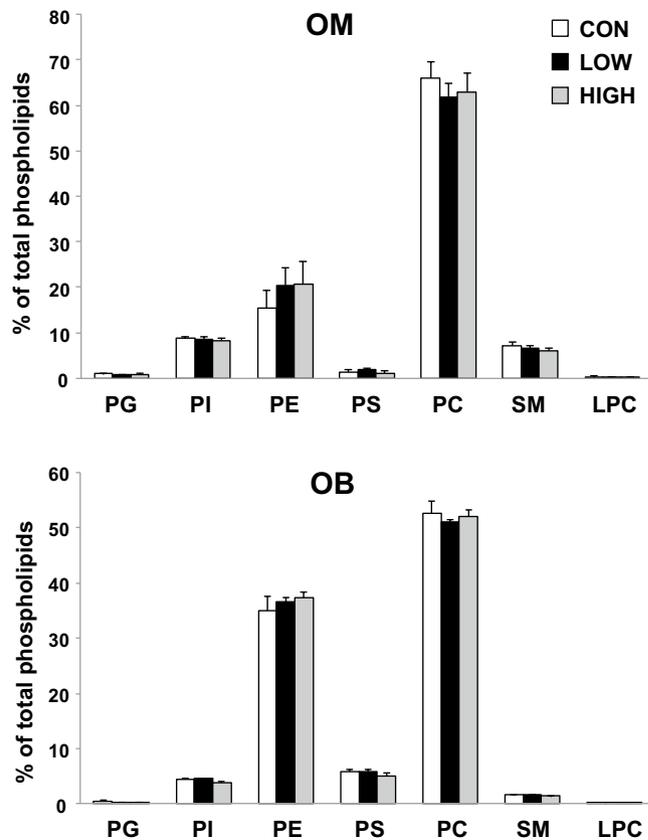


Figure 1. Phospholipid content of the olfactory mucosa (OM) and olfactory bulb (OB) of offspring. Data are expressed as the mean \pm S.E.M. ($n = 6$ mice/group). The experimental groups (LOW and HIGH) were compared to the control group (CON) using the non-parametric Mann–Whitney U test. No significant difference was observed (p values > 0.05). *PG* Phosphatidylglycerol, *PI* phosphatidylinositol, *PE* phosphatidylethanolamine, *PS* phosphatidylserine, *PC* phosphatidylcholine, *SM* sphingomyelin, *LPC* lysophosphatidylcholine.

the relative proportions of PL classes. However, consumption of n-3 PUFA unbalanced diets during pregnancy and lactation elicited qualitative changes in the FA profiles of the different PL classes in offspring OM, including those of plasmalogen subclasses. To summarize, feeding a low n-3 ALA diet led to a marked reduction in numerous DHA-containing species with a concomitant increase in AA-containing species, whereas consumption of a high n-3 PUFA diet reduced the prevalence of n-6 PUFA-containing species that was balanced by species containing n-3 long-chain PUFAs in PC and PE classes. These findings are in accordance with observations made in other neuronal tissues. N-3 PUFA deficiency was found to increase C22:4n-6-containing species and sometimes C22:5n-6-containing species in rodent brain PLs^{28–30}. Most often, these changes were observed in animals fed n-3 PUFA-depleted diets containing high amounts of LA. In the present study, it is important to emphasize that the LOW diet contained an adequate level of LA. On the other hand, dietary supplementation with n-3 PUFAs increases the incorporation of these FAs into brain PLs at the expense of n-6 PUFA-containing species^{31,32}. Similar effects were reported in the mammalian retina^{33–37}. This phenomenon, which is termed “reciprocal replacement”³⁸, is due to the competition between the precursors of the n-3 and n-6 PUFA families for elongation and desaturation enzymes (particularly for the first $\Delta 6$ -desaturation step, which is considered the rate-limiting step)³⁹. Competition might also occur during the de-esterification/re-esterification processes catalysed by enzymes such as long-chain acyl-CoA synthetases, phospholipases A2 and lysophospholipid acyltransferases. A complete replacement of DHA with C22:5n-6 has been observed in the rodent brain and retina in adulthood, but this would not be the case during postnatal development. Indeed, in addition to C22:5n-6, other n-6 PUFAs, such as C20:4n-6 and C22:4n-6, also contribute to replacing DHA in the brain and retina during the first weeks of life^{40,41}. In the present study, we observed that C22:5n-6 replaced DHA in the OM from LOW weaning mice, but the n-3 PUFA-deficient diet also induced a significant increase in C20:4n-6 and C22:4n-6. These results are in line with observations made in the brain and retina during neonatal development.

In accordance with previous studies that examined the effects of n-3 PUFA modulation in various regions of the rat brain, including the OB^{18–20}, we observed that the LOW and HIGH maternal diets induced significant changes in PUFA profiles in the OB from weaning mice. However, our data show that the deficiency in n-3 PUFAs elicited significant increases in C22:5n-6, C20:4n-6 and C22:4n-6, while only the C22:5n-6 level was enhanced in the rat OB. These qualitative discrepancies might result from developmental differences because in previous studies, FA analyses were performed in rats fed altered diets from conception until adulthood or during two generations. Differences in the diet formulation could also explain such divergences.

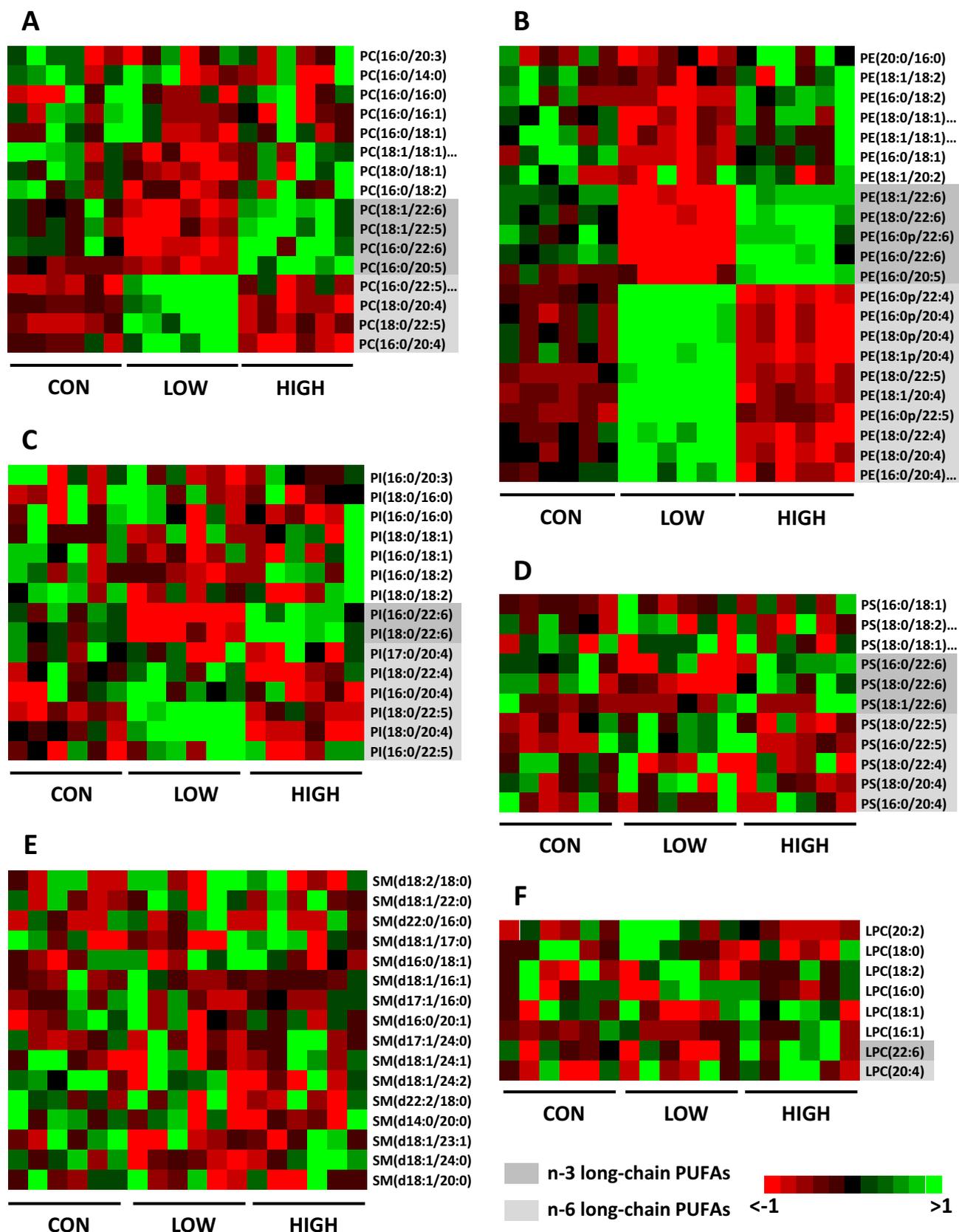


Figure 2. Heat maps of phospholipid molecular species in the offspring olfactory mucosa as a function of the dietary interventions (CON, LOW and HIGH diets). (A) Phosphatidylcholine (PC), (B) phosphatidylethanolamine and plasmeyl-ethanolamine (PE and PlsE), (C) phosphatidylserine (PS), (D) phosphatidylinositol (PI), (E) sphingomyelin (SM) and (F) lysophosphatidylcholine (LPC). A variability threshold (interquartile range <0.25) was applied prior to heat map analyses. All raw data can be found in Supplementary Tables S1–S6 online.

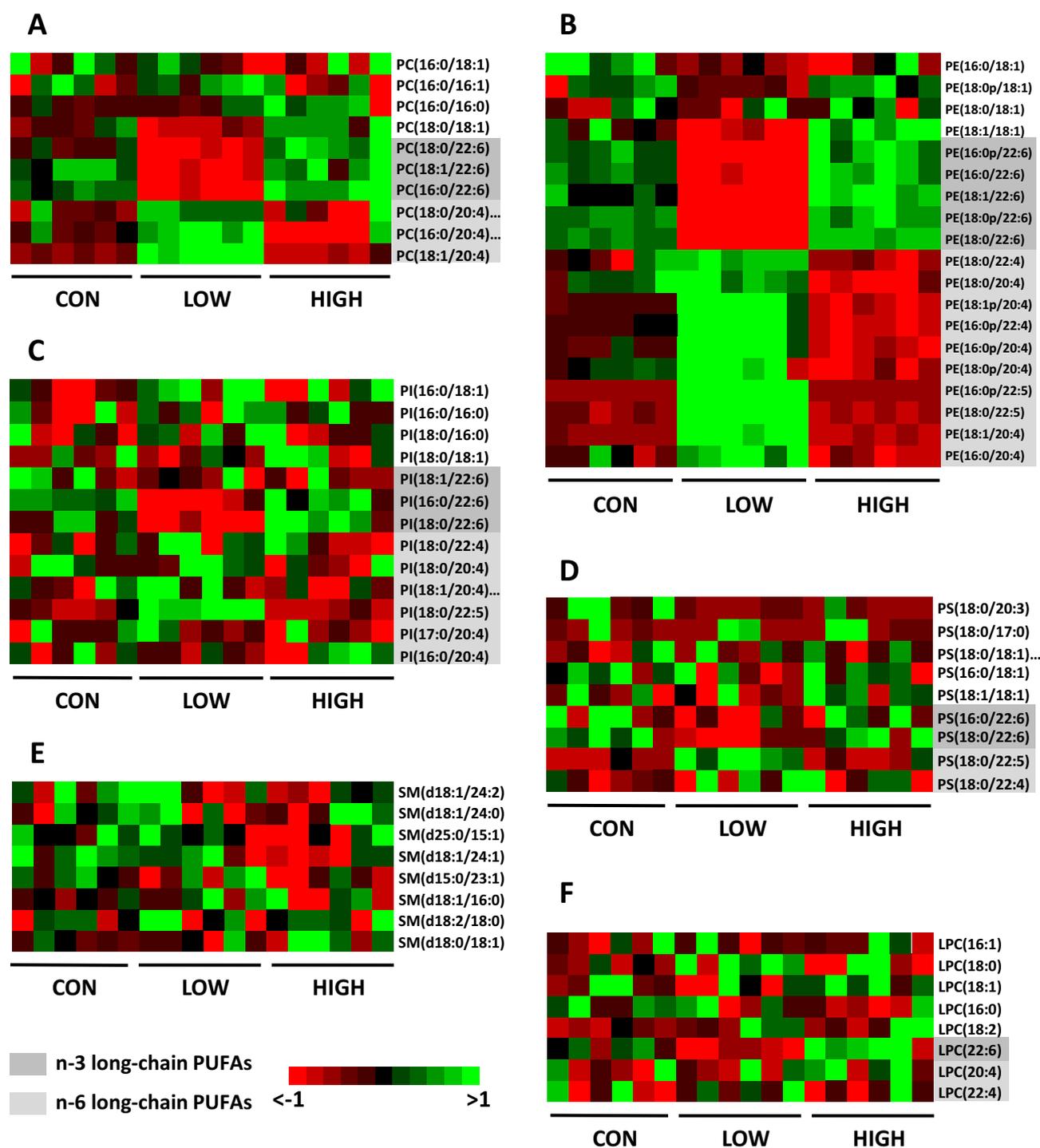


Figure 3. Heat maps of phospholipid molecular species in the offspring olfactory bulb as a function of the dietary interventions (CON, LOW and HIGH diets). (A) Phosphatidylcholine (PC), (B) phosphatidylethanolamine and plasmalogen (PE and PlsE), (C) phosphatidylserine (PS), (D) phosphatidylinositol (PI), (E) sphingomyelin (SM) and (F) lysophosphatidylcholine (LPC). A variability threshold (interquartile range < 0.25) was applied prior to heat map analyses. All raw data can be found in Supplementary Tables S7–S12 online.

It is also worth mentioning that in the OM from weaning mice, both diets (LOW and HIGH) were found to significantly increase the level of total PUFAs and to decrease the SFA content. Such an effect was not observed in the OB of these animals. One might speculate that the OM is particularly sensitive to FA unbalanced diets and that accordingly, the in situ PUFA synthesis pathways and/or PUFA cellular input are upregulated in response to unbalanced states.

Neurodevelopmental processes take place from the embryonic period through adolescence. This period is particularly sensitive to environmental disturbances, which can lead to neurological dysfunctions⁴². The maternal diet is a factor that can have important consequences on offspring. Animal studies have shown that altered PUFA status during pregnancy and early postnatal life lead to neural, visual and behavioural deficits in offspring⁹. In humans, several epidemiological studies have suggested that maternal supplementation with n-3 PUFAs either during pregnancy or lactation can have beneficial effects on the cognitive development and visual function of infants⁴¹. Since both the OM and OB are neuronal tissues, it can therefore be hypothesized that consuming a maternal diet with improperly balanced PUFA composition might impact the olfactory system. Olfactory discrimination deficits have been reported in rats fed n-3 PUFA-depleted diets^{18,43}. The olfactory regions affected by these diets as well as the possible mechanisms underlying these effects remain to be elucidated. Nevertheless, our study suggests that depletion of n-3 PUFAs in the OM and OB could be linked to the olfactory alterations observed in rats fed n-3 PUFA-depleted diets.

The modifications observed in the FA profiles of most PL classes in the OM and OB may have significant physiological consequences because of the importance of PL in shaping the membranes and regulating a wide range of cellular processes such as cell signalling and apoptosis. To date, there is no biochemical evidence that PLs play a functional role in olfactory signal transduction at the peripheral level. However, some observations support this idea. First, a member of the phospholipid flippase family has been shown to be essential for odourant responses in *Drosophila melanogaster*^{44,45}, suggesting that the PL composition of the OSN plasma membrane is an important factor for olfactory signalling. A number of studies also demonstrated that DHA-rich retinal PLs enhance the activity of rhodopsin, a receptor that belongs to the same G-protein-coupled receptor class as odourant receptors^{46–53}. Specific interactions between DHA and rhodopsin improve the stability of the receptor⁵⁴. Finally, phosphoinositides, which are PI phosphorylated derivatives, participate in olfactory signal transduction in OM neurons^{55,56}. Phosphatidylinositol(4,5)bisphosphate (PIP2) is the precursor of inositol(1,4,5) trisphosphate (IP3), a Ca²⁺ channel activator that plays a role in olfactory signal transduction in addition to the canonical cAMP signalling pathway^{55,57}. In addition, phosphoinositide-3-kinase-dependent mechanisms have been implicated in the inhibition of olfactory transduction in mammalian OSNs^{58,59}. In the present study, substantial modifications of the PI profile were observed in the OM from weaning mice exposed to n-3 PUFA unbalanced diets during pregnancy and lactation. The LOW diet caused a significant reduction in DHA-containing PI species and induced an increase in AA-containing species. One can envision that these changes could impair peripheral olfactory signalling catalysed by the PI pathway as well as the molecular interactions between DHA and odourant receptors.

There is compelling experimental evidence that PUFAs influence inflammatory cell function and inflammatory processes by a variety of mechanisms^{2,60}. In contrast to the pro-inflammatory actions of several members of the n-6 PUFA family, the major n-3 PUFAs are capable of partly impeding a wide number of inflammation-related events. They can act either directly or after transformation into acting bioactive metabolites⁶¹. N-3 PUFAs exert anti-inflammatory properties in numerous tissues, especially in nervous tissues. In the brain, DHA and specific metabolites, such as neuroprotectin D1, have been shown to reduce neurodegeneration processes, suggesting that these PUFAs may prevent ageing and neurodegenerative diseases⁶⁰. Several clinical and pre-clinical studies have also shown the neuroprotective effects of n-3 PUFAs in a number of ocular diseases, including glaucoma or optic neuropathy^{62,63}. Along with these tissues, olfactory tissues can manifest symptoms related to inflammation that might contribute to olfactory dysfunction. Factors such as viral and bacterial infections or environmental toxins can cause inflammatory conditions in the OM and induce loss of OSNs^{64,65}. The contaminating agents of the OM may spread thereafter to the OB, where inflammation can affect various cell types (neurons, astrocytes and microglia)^{64,66}. Because olfactory tissues are enriched in DHA and its precursors, it is quite conceivable that n-3 PUFAs may be crucial for optimal functioning and for preventing neuroinflammation in these tissues. Our study showed that an n-3-deficient diet reduced the availability of DHA and its precursors in the OM and OB and resulted in a concomitant increase in n-6 PUFA-containing species. It could increase the prevalence of eicosanoids, the pro-inflammatory n-6 derivatives, accelerating the inflammation processes in olfactory cells. PUFA anti- or pro-inflammatory activities imply the release of FAs esterified into PLs by phospholipase A2 (PLA2) enzymes. The PLA2s most frequently involved in the cellular production of bioactive lipids are cytosolic calcium-dependent PLA2 (cPLA2), cytosolic calcium-independent PLA2 (iPLA2), and secretory PLA2 (sPLA2). These different PLA2s have been detected in rodent OM⁶⁷ and OB^{68,69}, indicating that both n-3 and n-6 PUFAs can be released from PLs to exert their physiological effects in these tissues⁷⁰.

The present study showed that dietary n-3 PUFA deficiency during gestation and lactation induced a decrease in DHA levels in offspring olfactory tissues. Conversely, when dams were fed with an n-3 PUFA-enriched diet, increased DHA levels were recorded in olfactory tissues, especially in the OM. These observations clearly indicated that the maternal diet was capable of inducing significant changes in the FA composition of offspring olfactory tissues. Maternal dietary FAs are transferred to the foetus after crossing the placenta⁷¹ and are secreted in breast milk after birth⁷². Our results show that the milk FA profiles reflected the maternal diets. Similar to the LOW diet, the milk of the LOW dams contained a low n-3 FA level, whereas the milk of the HIGH group contained high amounts of n-3 PUFAs, as did the HIGH diet. However, in line with previous studies^{73,74}, small amounts of n-3 long-chain PUFAs (20:5n-3, 22:5n-3 and 22:6n-3) were detected in the milk of the LOW dams. It is assumed that the n-3 long-chain PUFAs would be the result of FA mobilization from maternal fat stores⁷⁴. Long-chain PUFA synthesis could also occur in the mammary gland during pregnancy and lactation in rodents⁷⁵. On the other hand, the n-6 PUFA level of the HIGH group milk is similar to that of the CON group milk. This stable level indicates that there is no compensatory mechanism to counterbalance the n-3 PUFA increase in this body fluid, in contrast to the reciprocal replacement phenomena recorded in olfactory tissues. Our study exemplifies the use of Mead acid (C20:3n-9) as a marker for not only dietary essential FA intake (i.e., LA and ALA) but also derivatives of these essential FAs (i.e., C20:5n-3 and DHA)⁷⁶. Indeed, C20:3n-9 was increased in

the milk of dams fed a diet with low levels of ALA. Notably, low ALA was sufficient to increase Mead acid levels since LA was adequate in the LOW diet. In contrast, the supplementation of a diet containing adequate levels of LA and ALA with long-chain n-3 PUFAs (C20:5n-3, 22:5n-3 and DHA) significantly lowered this marker compared to conditions with adequate levels of dietary LA and ALA only.

In conclusion, this study demonstrated that perinatal exposure of mice to diets deficient in ALA or supplemented in n-3 long-chain PUFAs significantly affects the PL composition of offspring olfactory tissues. This finding reinforces previous observations showing that nutritional factors can modulate the physiology of the olfactory system in mammals^{77–80}. This study also highlights the PUFA status of olfactory tissues as sensitive to modifications from the early stages of development. Disrupting PUFA status could have long-lasting effects on olfactory signalling.

Methods

Chemicals. Chloroform (CHCl₃), methanol (CH₃OH), ammonium acetate, acetonitrile (ACN) and H₂O of liquid chromatography-mass spectrometry grade were purchased from Fisher Scientific (Illkirch, France). Commercially available PL standards were purchased from Avanti Polar Lipids INC-Coger (Paris, France). Other chemical reagents were obtained from Merck (St Quentin Fallavier, France).

Animals. The experimental procedure was conducted in accordance with the guidelines of the European Community for the use and care of laboratory animals (2010/63/EU). It was approved by the local Ethics Committee (Comité d'Éthique de l'Expérimentation Animale Grand Campus Dijon; reference 01286.02) and the French Ministry for Research and Higher Education.

Twelve-week-old male and nulliparous female C57BL/6 mice were obtained from colonies established in the animal quarters of our laboratory (Centre des Sciences du Goût et de l'Alimentation, Dijon, France). They were maintained on a 12:12-h light–dark cycle and constant temperature conditions (20–22 °C). Female mice were placed for 5 days with males for mating and fed ad libitum with either one of the three experimental diets until weaning of their litters. Animals had free access to water.

The diets were prepared by the Experimental Foods Preparation Unit (INRAE, Jouy-en-Josas, France). They were formulated according to AIN-93G standards with 5% lipids⁸¹. The composition of the diets was as follows (g/kg): lipids, 50; casein, 200; corn starch, 418; sucrose, 100; maltodextrin, 132; cellulose, 50; mineral mix, 35; vitamin mix, 10; L-cystine, 3; choline bitartrate, 2.5. Commercial high-oleic sunflower oil, sunflower oil, palm oil, rapeseed oil and fish oil were mixed in various proportions to prepare the lipid blends that were incorporated into the different diets: the control diet (CON) had a ratio of n-6:n-3 of ~6, the low n-3 PUFA diet (LOW) had a ratio of n-6:n-3 of ~117, and the high n-3 PUFA diet (HIGH) had a ratio of n-6:n-3 of ~3 (Table 1). Compared to the CON diet, the LOW diet contained a lower level of ALA, whereas the HIGH diet contained n-3 long-chain PUFAs (C20:5n-3 (eicosapentaenoic acid), C22:5n-3 (docosapentaenoic acid) and DHA). The amount of LA in the diets accounted for 1.83% of total energy. This LA level is comparable to the level shown to be adequate to avoid n-6 PUFA deficiency symptoms in rats fed a diet containing 5% lipids (1–1.5% of total energy)²⁶. The formulations of the mineral and vitamin mixes are detailed in Simon et al.³⁶. All diets were stored at +4 °C until given to the animals.

At postnatal day 15, all pups were separated from their dams for 4 h. In order to avoid hypothermia, pups' cages were placed on a heating plate (28 × 20 cm; Gestigkeit, Düsseldorf, Germany) set at 37 °C. After 4 h of separation, dams were anaesthetized (intraperitoneal injection of ketamine (Imalgene 1000, Virbac, France; dose: 70 mg/kg in NaCl 0.9%) and xylazine (Rompun 2%, Bayer, Puteaux, France; dose: 14 mg/kg in NaCl 0.9%)) and then injected intraperitoneally with oxytocin (0.1 mL, Intervet, Unterschleissheim, Germany) to stimulate milk production. To further stimulate milk production and let-down, the females were gently massaged on the mammary regions. The 10 nipples of each female were aspirated using a Pasteur pipette to isolate a total amount of 0.5–1 mL of milk per female. Milk samples were snap-frozen and stored at –80 °C until FA analyses. After the milking procedure, awake dams and their pups were returned to their home cage.

At weaning, the dams and the female pups were anaesthetized by i.p. injection of ketamine and xylazine (150 mg/kg and 10 mg/kg bodyweight, respectively) and exsanguinated by decapitation under anaesthesia. The OM and OB were immediately removed and snap-frozen in liquid nitrogen. They were stored at –80 °C until further processing. Males were kept for further studies.

Lipid extraction. Total lipids from olfactory tissues and maternal milk were extracted according to the Folch procedure⁸². Briefly, each sample was homogenized in 10 mL of a mixture of CHCl₃/CH₃OH (2:1, v/v) and mixed with 2 mL of 0.73% NaCl. The homogenized mixture was centrifuged (3,000 rpm, 3 min), and the lower organic phase was collected and evaporated to dryness under a stream of nitrogen. Total lipids were re-dissolved in 1 mL of CHCl₃/CH₃OH 1:1 (v/v) and stored under nitrogen at –30 °C until further analyses.

Fatty acid composition. FA methyl esters were analysed by gas chromatography-flame ionization detection as previously described by Le Bon et al.¹⁷.

Separation and quantification of phospholipid classes by liquid chromatography coupled to charged aerosol detector (Corona-CAD). The phosphorus content of the total lipid extracts was determined according to the method developed by Bartlett and Lewis, 1970⁸³, as described previously⁸⁴. The samples were then diluted to the appropriate concentration of 500 µg/mL PLs in CHCl₃/CH₃OH 1:1 (v/v).

PL classes were first separated by liquid chromatography (LC) under hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC) conditions and then detected using a CORONA ULTRA RS Charged Aerosol Detector (CCAD,

Thermo Scientific, USA) to analyse complex lipids in a large range of polarity. Analysis methods including the detector parameters, instruments, elution gradient and other chromatographic separation conditions were recently published by Le Bon et al.¹⁷. This method allowed the separation and quantification of PI, PE, PS, PC, SM and LPC classes from lipid extracts of olfactory tissue samples.

Structural analysis of phospholipids by liquid chromatography coupled to mass spectrometry. *Chromatographic separation of phospholipids.* PL classes were separated by LC under HILIC conditions using an ACCUCORE HILIC LC column (150 × 2.1 mm, 2.6 μm, Thermo Scientific, USA), as described previously¹⁷. High-performance LC (HPLC) separation was achieved using an ULTIMATE 3,000 LC pump equipped with a dual-gradient pump and an ULTIMATE 3,000 Autosampler from Thermo Scientific (USA). The mobile phase consisted of (A) ACN/H₂O (95:5, v/v) containing 5 mM ammonium acetate and (B) ACN/H₂O (50:50, v/v) containing 10 mM ammonium acetate. The solvent-gradient system of the analytical pump was as follows: 0 min 100% A, 1 min 95% A, 20 min 80% A, 23 min 65% A, 24 min 100% A and 24–39 min 100% A. The flow rate was 800 μL/min, the injection volume was 10 μL, and the column was maintained at 40 °C. The flow from LC was split using an analytical fixed flow splitter (split ratio = 1:1, post-column) from Analytical Scientific Instruments (El Sobrante, CA, USA). The liquid chromatography system was controlled by STANDARD INSTRUMENT INTEGRATION (SII) software based on Dionex Chromeleon TN 7.

Characterization of phospholipid species. The ORBITRAP FUSION TRIBRID mass spectrometer (Thermo Scientific, USA) was used for high-resolution analyses to identify phospholipid molecular species in olfactory tissues, as described previously⁸⁵. This instrument was equipped with an EASY-MAX NG Ion Source (Heated Electrospray Ionization H-ESI) and was controlled by XCALIBUR 4.1 software. Positive and negative ions were monitored alternatively by switching the polarity approach with a spray voltage set to 3,500 V in positive and negative ion modes. The ORBITRAP mass analyser was used to obtain all mass spectra in full scan mode with the normal mass range and a target resolution of 240,000 (FWHM at m/z 200). A dynamic exclusion filter was applied with an exclusion duration of 15 s and a mass tolerance of 5 ppm. For tandem mass spectrometry (MS/MS) analyses, data-dependent mode was used for the characterization of PL species. Precursor isolation was performed in the quadrupole analyser with an isolation width of m/z 1.6. Higher-energy collisional dissociation (HCD) was employed for the fragmentation of PL species with an optimized stepped collision energy of 30% (± 5%). The linear ion trap was used to acquire spectra for fragment ions in data-dependent mode. The automatic gain control target was set to 2.10⁴ with a maximum injection time of 50 ms. The identification of all PL species was performed using the high-accuracy data and the information collected from fragmentation spectra with the help of LIPIDSEARCH software (version 4.1.16) and the LIPID MAPS database.

Quantification of phospholipid species. Samples were diluted to the appropriate concentration of 25 μg/mL PLs in CHCl₃/CH₃OH (1:1, v/v) for analysis. The LC system under HILIC conditions was coupled to a triple quadrupole mass spectrometer (Thermo Finnigan TSQ Quantum) equipped with a standard electrospray ionization source to quantify phospholipid molecular species. Specific acquisition methods in positive and negative ion modes were optimized and used according to the studied compounds. PC, PlsC and SM species were quantified in positive ion mode by precursor ion scanning of m/z 184 amu, which corresponds to the choline head group. PE species lose their ethanolamine phosphate head group as a neutral fragment of 141 Da. Therefore, neutral loss scanning of 141 Da in positive ion mode was used for the selective detection and quantification of PE. Similarly, PS species lose their serine-phosphate head group as a neutral fragment of 185 Da. Therefore, neutral loss scanning of 185 Da in positive ion mode was used to quantify PS compounds. PI species show in negative ion mode a fragment at m/z 241 amu identified as inositol phosphate minus one molecule of H₂O. This fragment was used for precursor ion scanning to quantify these compounds. The quantification of PlsE was performed in negative ionization mode by multiple reaction monitoring (MRM) of the parent/fragment transition for each selected plasmalogen. The data were processed using XCALIBUR software. In addition, corrections were applied to the data for isotopic overlap. More details about the electrospray source parameters and mass spectrometer methods are available in Le Bon et al.¹⁷.

Statistical analyses. Values are expressed as the mean ± standard error of the mean (S.E.M.). Statistical analyses were carried out using STATISTICA 12.0 (StatSoft, Inc.). The non-parametric Mann–Whitney *U* test was used to perform comparisons between the control group and the experimental groups. Differences were considered significant at $p < 0.05$. Heat maps were generated using XLSTAT (Addinsoft).

Received: 13 February 2020; Accepted: 15 May 2020

Published online: 01 July 2020

References

1. Bazinet, R. P. & Laye, S. Polyunsaturated fatty acids and their metabolites in brain function and disease. *Nat. Rev. Neurosci.* **15**, 771–785. <https://doi.org/10.1038/nrn3820> (2014).
2. Calder, P. C. Omega-3 fatty acids and inflammatory processes: From molecules to man. *Biochem. Soc. Trans.* **45**, 1105–1115. <https://doi.org/10.1042/bst20160474> (2017).
3. Saini, R. K. & Keum, Y. S. Omega-3 and omega-6 polyunsaturated fatty acids: Dietary sources, metabolism, and significance: A review. *Life Sci.* **203**, 255–267. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2018.04.049> (2018).
4. Sinclair, A. J. Long-chain polyunsaturated fatty acids in the mammalian brain. *Proc. Nutr. Soc.* **34**, 287–291 (1975).
5. Fliesler, S. J. & Anderson, R. E. Chemistry and metabolism of lipids in the vertebrate retina. *Prog. Lipid Res.* **22**, 79–131 (1983).

6. Bretillon, L. *et al.* Lipid and fatty acid profile of the retina, retinal pigment epithelium/choroid, and the lacrimal gland, and associations with adipose tissue fatty acids in human subjects. *Exp. Eye Res.* **87**, 521–528. [https://doi.org/10.1016/j.exer.2008.08.010S014-4835\(08\)00290-X](https://doi.org/10.1016/j.exer.2008.08.010S014-4835(08)00290-X) (2008).
7. Plourde, M. & Cunnane, S. C. Extremely limited synthesis of long chain polyunsaturates in adults: Implications for their dietary essentiality and use as supplements. *Appl. Physiol. Nutr. Metab.* **32**, 619–634. <https://doi.org/10.1139/h07-034> (2007).
8. Wainwright, P. E. Dietary essential fatty acids and brain function: A developmental perspective on mechanisms. *Proc. Nutr. Soc.* **61**, 61–69 (2002).
9. Brenna, J. T. Animal studies of the functional consequences of suboptimal polyunsaturated fatty acid status during pregnancy, lactation and early post-natal life. *Matern. Child Nutr.* **7**(Suppl 2), 59–79. <https://doi.org/10.1111/j.1740-8709.2011.00301.x> (2011).
10. Labrousse, V. F. *et al.* Short-term long chain omega3 diet protects from neuroinflammatory processes and memory impairment in aged mice. *PLoS ONE* **7**, e36861. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0036861> (2012).
11. Demmelmair, H. & Koletzko, B. Importance of fatty acids in the perinatal period. *World Rev. Nutr. Diet.* **112**, 31–47. <https://doi.org/10.1159/000365427> (2015).
12. Lozada, L. E., Desai, A., Kevala, K., Lee, J. W. & Kim, H. Y. Perinatal brain docosahexaenoic acid concentration has a lasting impact on cognition in mice. *J. Nutr.* **147**, 1624–1630. <https://doi.org/10.3945/jn.117.254607> (2017).
13. de Velasco, P. C. *et al.* Nutritional restriction of omega-3 fatty acids alters topographical fine tuning and leads to a delay in the critical period in the rodent visual system. *Exp. Neurol.* **234**, 220–229. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2011.12.032> (2012).
14. Weisinger, H. S., Vingrys, A. J. & Sinclair, A. J. The effect of docosahexaenoic acid on the electroretinogram of the guinea pig. *Lipids* **31**, 65–70. <https://doi.org/10.1007/bf02522413> (1996).
15. Bourre, J. M. *et al.* The effects of dietary alpha-linolenic acid on the composition of nerve membranes, enzymatic activity, amplitude of electrophysiological parameters, resistance to poisons and performance of learning tasks in rats. *J. Nutr.* **119**, 1880–1892. <https://doi.org/10.1093/jn/119.12.1880> (1989).
16. Le Bon, A. M., Datiche, F., Gascuel, J. & Grosmaître, X. In: Flavour: From Food to Perception (eds Guichard, E. *et al.*) 1–33 (Wiley, Hoboken, 2017).
17. Le Bon, A. M. *et al.* Comprehensive study of rodent olfactory tissue lipid composition. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* **131**, 32–43. <https://doi.org/10.1016/j.plefa.2018.03.008> (2018).
18. Hichami, A. *et al.* Olfactory discrimination ability and brain expression of c-fos, Gir and Glut1 mRNA are altered in n-3 fatty acid-depleted rats. *Behav. Brain Res.* **184**, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2007.06.010> (2007).
19. Hamilton, L., Greiner, R., Salem, N. Jr. & Kim, H. Y. n-3 fatty acid deficiency decreases phosphatidylserine accumulation selectively in neuronal tissues. *Lipids* **35**, 863–869 (2000).
20. Levant, B., Ozias, M. K., Jones, K. A. & Carlson, S. E. Differential effects of modulation of docosahexaenoic acid content during development in specific regions of rat brain. *Lipids* **41**, 407–414 (2006).
21. Holman, R. T. The ratio of trienoic: Tetraenoic acids in tissue lipids as a measure of essential fatty acid requirement. *J. Nutr.* **70**, 405–410. <https://doi.org/10.1093/jn/70.3.405> (1960).
22. Patterson, A. C., Chalil, A., Aristizabal Henao, J. J., Streit, I. T. & Stark, K. D. Omega-3 polyunsaturated fatty acid blood biomarkers increase linearly in men and women after tightly controlled intakes of 0.25, 0.5, and 1 g/d of EPA + DHA. *Nutr. Res.* **35**, 1040–1051. <https://doi.org/10.1016/j.nutres.2015.09.016> (2015).
23. Flock, M. R., Harris, W. S. & Kris-Etherton, P. M. Long-chain omega-3 fatty acids: Time to establish a dietary reference intake. *Nutr. Rev.* **71**, 692–707. <https://doi.org/10.1111/nure.12071> (2013).
24. Salem, N. Jr. & Eggersdorfer, M. Is the world supply of omega-3 fatty acids adequate for optimal human nutrition?. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care* **18**, 147–154. <https://doi.org/10.1097/MCO.0000000000000145> (2015).
25. Stark, K. D., Van Elswyk, M. E., Higgins, M. R., Weatherford, C. A. & Salem, N. Jr. Global survey of the omega-3 fatty acids, docosahexaenoic acid and eicosapentaenoic acid in the blood stream of healthy adults. *Progr. Lipid Res.* **63**, 132–152. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2016.05.001> (2016).
26. Choque, B., Catheline, D., Delplanque, B., Guesnet, P. & Legrand, P. Dietary linoleic acid requirements in the presence of a-linolenic acid are lower than the historical 2 % of energy intake value, study in rats. *Br. J. Nutr.* **113**, 1056–1068. <https://doi.org/10.1017/S0007114515000094> (2015).
27. Russell, Y., Evans, P. & Dodd, G. H. Characterization of the total lipid and fatty acid composition of rat olfactory mucosa. *J. Lipid Res.* **30**, 877–884 (1989).
28. Murthy, M. *et al.* Differential effects of n-3 fatty acid deficiency on phospholipid molecular species composition in the rat hippocampus. *J. Lipid Res.* **43**, 611–617 (2002).
29. Li, D. *et al.* Omega 6 to omega 3 fatty acid imbalance early in life leads to persistent reductions in DHA levels in glycerophospholipids in rat hypothalamus even after long-term omega 3 fatty acid repletion. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* **74**, 391–399. <https://doi.org/10.1016/j.plefa.2006.03.010> (2006).
30. Novak, E. M., Dyer, R. A. & Innis, S. M. High dietary omega-6 fatty acids contribute to reduced docosahexaenoic acid in the developing brain and inhibit secondary neurite growth. *Brain Res.* **1237**, 136–145. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2008.07.107> (2008).
31. Lamaziere, A. *et al.* Differential distribution of DHA-phospholipids in rat brain after feeding: A lipidomic approach. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* **84**, 7–11. <https://doi.org/10.1016/j.plefa.2010.11.001> (2011).
32. Little, S. J., Lynch, M. A., Manku, M. & Nicolaou, A. Docosahexaenoic acid-induced changes in phospholipids in cortex of young and aged rats: A lipidomic analysis. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* **77**, 155–162. <https://doi.org/10.1016/j.plefa.2007.08.009> (2007).
33. Bazan, N. G. & Scott, B. L. Dietary omega-3 fatty acids and accumulation of docosahexaenoic acid in rod photoreceptor cells of the retina and at synapses. *Ups J. Med. Sci. Suppl.* **48**, 97–107 (1990).
34. Neuringer, M., Connor, W. E., Lin, D. S., Barstad, L. & Luck, S. Biochemical and functional effects of prenatal and postnatal omega 3 fatty acid deficiency on retina and brain in rhesus monkeys. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **83**, 4021–4025 (1986).
35. Schnebelen, C. *et al.* Nutrition for the eye: Different susceptibility of the retina and the lacrimal gland to dietary omega-6 and omega-3 polyunsaturated fatty acid incorporation. *Ophthalmic Res.* **41**, 216–224. <https://doi.org/10.1159/000217726> (2009).
36. Simon, E. *et al.* Decreasing dietary linoleic acid promotes long chain omega-3 fatty acid incorporation into rat retina and modifies gene expression. *Exp. Eye Res.* **93**, 628–635. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2011.07.016> (2011).
37. Lin, D. S., Anderson, G. J., Connor, W. E. & Neuringer, M. Effect of dietary N-3 fatty acids upon the phospholipid molecular species of the monkey retina. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* **35**, 794–803 (1994).
38. Galli, C., Trzeciak, H. I. & Paoletti, R. Effects of dietary fatty acids on fatty acid composition of brain ethanolamine phosphoglyceride—Reciprocal replacement of n-6 and n-3 polyunsaturated fatty acids. *Biochim. Biophys. Acta* **248**, 449–450. [https://doi.org/10.1016/0005-2760\(71\)90233-5](https://doi.org/10.1016/0005-2760(71)90233-5) (1971).
39. Yamazaki, K., Fujikawa, M., Hamazaki, T., Yano, S. & Shono, T. Comparison of the conversion rates of alpha-linolenic acid (18:3(n-3)) and stearidonic acid (18:4(n-3)) to longer polyunsaturated fatty acids in rats. *Biochim. Biophys. Acta* **1123**, 18–26 (1992).
40. Greiner, R. S., Catalan, J. N., Moriguchi, T. & Salem, N. Jr. Docosapentaenoic acid does not completely replace DHA in n-3 FA-deficient rats during early development. *Lipids* **38**, 431–435 (2003).

41. Salem, N. Jr., Loewke, J., Catalan, J. N., Majchrzak, S. & Moriguchi, T. Incomplete replacement of docosahexaenoic acid by n-6 docosapentaenoic acid in the rat retina after an n-3 fatty acid deficient diet. *Exp. Eye Res.* **81**, 655–663. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2005.04.003> (2005).
42. Rice, D. & Barone, S. Jr. Critical periods of vulnerability for the developing nervous system: evidence from humans and animal models. *Environ. Health Perspect.* **108**(Suppl 3), 511–533. <https://doi.org/10.1289/ehp.00108s3511> (2000).
43. Greiner, R. S., Moriguchi, T., Slotnick, B. M., Hutton, A. & Salem, N. Olfactory discrimination deficits in n-3 fatty acid-deficient rats. *Physiol. Behav.* **72**, 379–385 (2001).
44. Ha, T. S., Xia, R., Zhang, H., Jin, X. & Smith, D. P. Lipid flippase modulates olfactory receptor expression and odorant sensitivity in *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **111**, 7831–7836. <https://doi.org/10.1073/pnas.1401938111> (2014).
45. Liu, Y. C. *et al.* The *Drosophila melanogaster* phospholipid flippase dATP8B is required for odorant receptor function. *PLoS Genet.* **10**, e1004209. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1004209> (2014).
46. Mitchell, D. C., Niu, S. L. & Litman, B. J. DHA-rich phospholipids optimize G-Protein-coupled signaling. *J. Pediatr.* **143**, S80–86 (2003).
47. Niu, S. L. *et al.* Reduced G protein-coupled signaling efficiency in retinal rod outer segments in response to n-3 fatty acid deficiency. *J. Biol. Chem.* **279**, 31098–31104. <https://doi.org/10.1074/jbc.M404376200> (2004).
48. Bennett, M. P. & Mitchell, D. C. Regulation of membrane proteins by dietary lipids: Effects of cholesterol and docosahexaenoic acid acyl chain-containing phospholipids on rhodopsin stability and function. *Biophys. J.* **95**, 1206–1216. <https://doi.org/10.1529/biophysj.107.122788> (2008).
49. Feller, S. E. Acyl chain conformations in phospholipid bilayers: A comparative study of docosahexaenoic acid and saturated fatty acids. *Chem. Phys. Lipids* **153**, 76–80. <https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2008.02.013> (2008).
50. Litman, B. J., Niu, S. L., Polozova, A. & Mitchell, D. C. The role of docosahexaenoic acid containing phospholipids in modulating G protein-coupled signaling pathways: Visual transduction. *J. Mol. Neurosci.* **16**, 237–242. <https://doi.org/10.1385/jmn.16.2-3:237> (2001).
51. Mitchell, D. C., Niu, S. L. & Litman, B. J. Enhancement of G protein-coupled signaling by DHA phospholipids. *Lipids* **38**, 437–443 (2003).
52. Parrill, A. L. & Tigyi, G. Integrating the puzzle pieces: The current atomistic picture of phospholipid-G protein coupled receptor interactions. *Biochim. Biophys. Acta* **2–12**, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.bbali.2012.09.002> (1831).
53. Senapati, S. *et al.* Effect of dietary docosahexaenoic acid on rhodopsin content and packing in photoreceptor cell membranes. *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* **1403–1413**, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2018.03.030> (1860).
54. Sanchez-Martin, M. J., Ramon, E., Torrent-Burgues, J. & Garriga, P. Improved conformational stability of the visual G protein-coupled receptor rhodopsin by specific interaction with docosahexaenoic acid phospholipid. *ChemBioChem* **14**, 639–644. <https://doi.org/10.1002/cbic.201200687> (2013).
55. Klasen, K. *et al.* Odorant-stimulated phosphoinositide signaling in mammalian olfactory receptor neurons. *Cell Signal.* **22**, 150–157. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2009.09.026> (2010).
56. Ukhanov, K., Corey, E. A. & Ache, B. W. Phosphoinositide 3-kinase dependent inhibition as a broad basis for opponent coding in mammalian olfactory receptor neurons. *PLoS ONE* **8**, e61553. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061553> (2013).
57. Boekhoff, I. & Breer, H. Termination of second messenger signaling in olfaction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **89**, 471–474 (1992).
58. Ache, B. W. Odorant-specific modes of signaling in mammalian olfaction. *Chem. Senses* **35**, 533–539. <https://doi.org/10.1093/chemse/bjq045> (2010).
59. Ukhanov, K., Corey, E. & Ache, B. W. Phosphoinositide-3-kinase is the primary mediator of phosphoinositide-dependent inhibition in mammalian olfactory receptor neurons. *Front. Cell Neurosci.* **10**, 97. <https://doi.org/10.3389/fncel.2016.00097> (2016).
60. Zarate, R., El Jaber-Vazdekis, N., Tejera, N., Perez, J. A. & Rodriguez, C. Significance of long chain polyunsaturated fatty acids in human health. *Clin. Transl. Med.* **6**, 25. <https://doi.org/10.1186/s40169-017-0153-6> (2017).
61. Bazan, N. G. Docosanoids and elovanoids from omega-3 fatty acids are pro-homeostatic modulators of inflammatory responses, cell damage and neuroprotection. *Mol. Aspects Med.* **64**, 18–33. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2018.09.003> (2018).
62. Kalogerou, M. *et al.* Omega-3 fatty acids protect retinal neurons in the DBA/2J hereditary glaucoma mouse model. *Exp. Eye Res.* **167**, 128–139. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2017.12.005> (2018).
63. Georgiou, T. *et al.* Neuroprotective effects of omega-3 polyunsaturated fatty acids in a rat model of anterior ischemic optic neuropathy. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* **58**, 1603–1611. <https://doi.org/10.1167/iovs.16-20979> (2017).
64. Islam, Z., Harkema, J. R. & Pestka, J. J. Satratoxin G from the black mold *Stachybotrys chartarum* evokes olfactory sensory neuron loss and inflammation in the murine nose and brain. *Environ. Health Perspect.* **114**, 1099–1107. <https://doi.org/10.1289/ehp.8854> (2006).
65. Imamura, F. & Hasegawa-Ishii, S. Environmental toxicants-induced immune responses in the olfactory mucosa. *Front. Immunol.* **7**, 475. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00475> (2016).
66. Herbert, R. P. *et al.* Cytokines and olfactory bulb microglia in response to bacterial challenge in the compromised primary olfactory pathway. *J. Neuroinflamm.* **9**, 109. <https://doi.org/10.1186/1742-2094-9-109> (2012).
67. Ibarra-Soria, X., Levitin, M. O., Saraiva, L. R. & Logan, D. W. The olfactory transcriptomes of mice. *PLoS Genet.* **10**, e1004593. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1004593> (2014).
68. Kishimoto, K., Matsumura, K., Kataoka, Y., Morii, H. & Watanabe, Y. Localization of cytosolic phospholipase A2 messenger RNA mainly in neurons in the rat brain. *Neuroscience* **92**, 1061–1077 (1999).
69. Ma, M. T., Nevalainen, T. J., Yeo, J. F. & Ong, W. Y. Expression profile of multiple secretory phospholipase A(2) isoforms in the rat CNS: Enriched expression of sPLA(2)-IIA in brainstem and spinal cord. *J. Chem. Neuroanat.* **39**, 242–247. <https://doi.org/10.1016/j.jchemneu.2010.02.002> (2010).
70. Strokina, M., Sergeeva, M. & Reiser, G. Docosahexaenoic acid and arachidonic acid release in rat brain astrocytes is mediated by two separate isoforms of phospholipase A2 and is differently regulated by cyclic AMP and Ca²⁺. *Br. J. Pharmacol.* **139**, 1014–1022. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0705326> (2003).
71. Herrera, E. Implications of dietary fatty acids during pregnancy on placental, fetal and postnatal development: A review. *Placenta* **23**(Suppl A), S9–19. <https://doi.org/10.1053/plac.2002.0771> (2002).
72. Demmelmair, H. & Koletzko, B. Lipids in human milk. *Best. Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* **32**, 57–68. <https://doi.org/10.1016/j.beem.2017.11.002> (2018).
73. Haubner, L. Y. *et al.* Maternal dietary docosahexaenoic acid content affects the rat pup auditory system. *Brain Res. Bull.* **58**, 1–5 (2002).
74. Jen, K. L. *et al.* Perinatal n-3 fatty acid imbalance affects fatty acid composition in rat offspring. *Physiol. Behav.* **98**, 17–24. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2009.03.031> (2009).
75. Sosa-Castillo, E., Rodriguez-Cruz, M. & Molto-Puigmarti, C. Genomics of lactation: Role of nutrigenomics and nutrigenetics in the fatty acid composition of human milk. *Br. J. Nutr.* **118**, 161–168. <https://doi.org/10.1017/s0007114517001854> (2017).
76. Fokkema, M. R. *et al.* Assessment of essential fatty acid and omega3-fatty acid status by measurement of erythrocyte 20:3omega9 (Mead acid), 22:5omega6/20:4omega6 and 22:5omega6/22:6omega3. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* **67**, 345–356. <https://doi.org/10.1054/plef.2002.0440> (2002).
77. Thiebaut, N. *et al.* Hyperlipidemic diet causes loss of olfactory sensory neurons, reduces olfactory discrimination, and disrupts odor-reversal learning. *J. Neurosci.* **34**, 6970–6984. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.3366-13.2014> (2014).

78. Lacroix, M. C. *et al.* Long-lasting metabolic imbalance related to obesity alters olfactory tissue homeostasis and impairs olfactory-driven behaviors. *Chem. Senses* **40**, 537–556. <https://doi.org/10.1093/chemse/bjv039> (2015).
79. Riviere, S. *et al.* High fructose diet inducing diabetes rapidly impacts olfactory epithelium and behavior in mice. *Sci. Rep.* **6**, 34011. <https://doi.org/10.1038/srep34011> (2016).
80. Merle, L. *et al.* Maternal high fat high sugar diet disrupts olfactory behavior but not mucosa sensitivity in the offspring. *Psychoneuroendocrinology* **104**, 249–258. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2019.02.005> (2019).
81. Reeves, P. G., Nielsen, F. H. & Fahey, G. C. Jr. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *J. Nutr.* **123**, 1939–1951 (1993).
82. Folch, J., Lees, M. & Sloane Stanley, G. H. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J. Biol. Chem.* **226**, 497–509 (1957).
83. Bartlett, E. M. & Lewis, D. H. Spectrophotometric determination of phosphate esters in the presence and absence of orthophosphate. *Anal. Biochem.* **36**, 159–167 (1970).
84. Acar, N. *et al.* Lipid composition of the human eye: Are red blood cells a good mirror of retinal and optic nerve fatty acids?. *PLoS ONE* **7**, e35102. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0035102> (2012).
85. Albouery, M. *et al.* Age-related changes in the gut microbiota modify brain lipid composition. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **9**, 444–444. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2019.00444> (2020).

Acknowledgements

The authors acknowledge the staff of the animal facility of the Centre des Sciences du Goût et de l'Alimentation (Dijon, France) for animal care. This work was supported by the Groupe Lipides et Nutrition (GLN), the Conseil Régional Bourgogne Franche-Comté, the European Regional Development Fund (FEDER), the Institut National de Recherche en Agriculture, Alimentation et Environnement (INRAE), and the Fondation de France/Fondation de l'Oeil.

Author contributions

A.M.L.B., N.A., L.B., O.B. and X.G. conceived and designed the study; V.S. set up and supervised the animal experiment procedures. V.S., L.M. and D.J. collected tissue samples; S.K., S.G., S.C. and N.D. performed the lipid analyses; S.K. and A.M.L.B. analysed and interpreted the data; A.M.L.B., S.K., N.A., L.B. and O.B. wrote the paper. All authors read and approved the final manuscript.

Competing interests

The authors declare no competing interests.

Additional information

Supplementary information is available for this paper at <https://doi.org/10.1038/s41598-020-67725-9>.

Correspondence and requests for materials should be addressed to A.M.L.B.

Reprints and permissions information is available at www.nature.com/reprints.

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2020

b. Progéniture mâle

Des travaux menés chez l'Homme et les rongeurs ont montré que les teneurs en AG dans le plasma et les tissus peuvent varier en fonction du genre (Childs *et al.*, 2008; Lohner *et al.*, 2013). Ainsi, la teneur plasmatique en DHA est plus importante chez les individus de genre féminin et ce, quel que soit le régime alimentaire. Plusieurs mécanismes ont été avancés pour expliquer cette différence : une activité de β -oxydation plus importante chez les individus de genre féminin, une différence dans la composition et la mobilisation des AGPI à partir du tissu adipeux, l'influence des hormones sexuelles sur le métabolisme des AG. Des analyses conduites chez la femme et les rats femelles ont montré que les œstrogènes stimulent l'activité des enzymes impliquées dans la synthèse des AGPI tandis que la testostérone l'inhibe.

Nous avons donc également analysé l'impact des régimes maternels déséquilibrés en AGPI n-3 sur le profil en AG de la MO des souriceaux mâles âgés de 3 semaines.

- Résultats

➤ Effets des régimes chez les souriceaux mâles

Comparés au groupe CON, les régimes LOW et HIGH modifient la teneur en AGPI n-3 et n-6 de la MO (**Tableau 6**). Dans la MO des souriceaux LOW, la teneur en AGPI n-6 est fortement augmentée (+ 46%) tandis que la teneur en AGPI n-3 diminue de 62%. La MO du groupe LOW contient davantage de 20:2n-6 (+25%), 20:4n-6 (+32%), 22:4n-6 (x 1.8) et 22:5n-6 (x 9) et moins de 18:3n-3 (-58%), 20:5n-3 (-74%), 22:5n-3 (-72%) et 22:6n-3 (-60%) que la MO du groupe CON. Le régime HIGH modifie également le profil des AG de la MO des souriceaux mâles. La teneur totale en AGPI n-6 est diminuée de 10% tandis que celle en AGPI n-3 est augmentée de 22%. On observe une diminution du 20:4n-6 (-19%), 22:4n-6 (-36%) et du 22:5n-6 (-74%) et, de manière surprenante, une augmentation du 18:2n-6 (+30%), du 20:2n-6 (+14%), du 20:3n-6 (15%). Les teneurs en 20:5n-3, 22:5n-3 et 22:6n-3 sont augmentées respectivement par un facteur 2,4, 1,7 et 1,13. Le régime HIGH augmente également la teneur en 14:0 (+ 47%) et diminue la teneur en 15:0 (-12%), 18:1t (-22%), 16:1n-9 (-22%), 20:3n-9 (-36%). Enfin,

comparé au groupe CON, le ratio n-6/n-3 augmente dans le groupe LOW (x 4) et diminue dans le groupe HIGH (-26%).

Les régimes LOW et HIGH ne modifient pas les teneurs totales en AG saturés, AG mono-insaturés, AGPI et diméthyl acétals (DMA) de la MO de la progéniture mâle.

Tableau 6 : Profil des acides gras de la muqueuse olfactive de souriceaux mâles âgés de 3 semaines, nés de mères sous régimes CON, LOW ou HIGH depuis la conception (n=6 souris/groupe). Les données représentent les moyennes \pm e.s.m. Le test non paramétrique de Mann Whitney a été utilisé pour comparer les données des groupes LOW et HIGH à celles du groupe CON. * $p < 0,05$.

Fatty acids (% of total FA)	Male offspring' olfactory mucosa		
	CON	LOW	HIGH
14:0	0,63 \pm 0,07	0,82 \pm 0,11	0,93 \pm 0,11
15:0	0,11 \pm 0,00	0,09 \pm 0,00	0,09* \pm 0,00
dma16:0	3,87 \pm 0,04	3,80 \pm 0,10	3,76 \pm 0,07
16:0	24,70 \pm 0,23	23,36 \pm 0,39	23,62 \pm 0,40
16:1n-9	0,56 \pm 0,01	0,54 \pm 0,01	0,44* \pm 0,01
16:1n-7	0,95 \pm 0,06	0,93 \pm 0,16	1,20 \pm 0,15
17:0	0,14 \pm 0,00	0,13 \pm 0,00	0,14 \pm 0,00
dma18:0	0,91 \pm 0,03	0,95 \pm 0,02	0,96 \pm 0,02
dma18:1n-9	0,57 \pm 0,02	0,60 \pm 0,02	0,56 \pm 0,02
dma18:1n-7	0,24 \pm 0,02	0,27 \pm 0,02	0,25 \pm 0,02
18:0	16,44 \pm 0,25	16,25 \pm 0,23	16,09 \pm 0,36
18:1t	0,07 \pm 0,00	0,06 \pm 0,00	0,05* \pm 0,00
18:1n-9	13,29 \pm 0,21	13,01 \pm 0,33	13,57 \pm 0,24
18:1n-7	2,79 \pm 0,06	2,81 \pm 0,04	2,64 \pm 0,04
18:2n-6	3,67 \pm 0,19	3,40 \pm 0,19	4,80* \pm 0,08
20:0	0,16 \pm 0,01	0,16 \pm 0,01	0,17 \pm 0,01
18:3n-6	0,10 \pm 0,00	0,09 \pm 0,00	0,10 \pm 0,00
20:1n-9	0,47 \pm 0,11	0,41 \pm 0,05	0,60 \pm 0,09
18:3n-3	0,04 \pm 0,01	0,02* \pm 0,00	0,06 \pm 0,01
20:1n-7	0,07 \pm 0,01	0,06 \pm 0,01	0,07 \pm 0,01
20:2n-6	0,29 \pm 0,02	0,36* \pm 0,02	0,33 \pm 0,01
20:3n-9	0,38 \pm 0,02	0,39 \pm 0,02	0,24* \pm 0,01
22:0	0,13 \pm 0,02	0,17 \pm 0,03	0,19 \pm 0,03
20:3n-6	1,33 \pm 0,03	1,34 \pm 0,06	1,53* \pm 0,03
22:1n-9	0,14 \pm 0,01	0,13* \pm 0,01	0,13 \pm 0,01
20:4n-6	13,22 \pm 0,17	17,53* \pm 0,43	10,74* \pm 0,21
20:5n-3	0,55 \pm 0,02	0,15* \pm 0,00	1,35* \pm 0,05
24:0	0,20 \pm 0,01	0,19 \pm 0,01	0,22 \pm 0,02
24:1n-9	0,25 \pm 0,02	0,27 \pm 0,02	0,27 \pm 0,03
22:4n-6	1,29 \pm 0,03	2,35* \pm 0,13	0,82* \pm 0,03
22:5n-6	0,52 \pm 0,03	4,73* \pm 0,26	0,14* \pm 0,00
22:5n-3	0,57 \pm 0,02	0,16* \pm 0,01	1,00* \pm 0,04
22:6n-3	11,38 \pm 0,19	4,51* \pm 0,35	12,94* \pm 0,41
SFAs	42,52 \pm 0,41	41,12 \pm 0,52	41,45 \pm 0,53
MUFAs	18,57 \pm 0,33	18,21 \pm 0,58	18,96 \pm 0,47
PUFAs	33,33 \pm 0,49	35,01 \pm 0,58	34,05 \pm 0,71
DMAs	5,59 \pm 0,09	5,62 \pm 0,09	5,53 \pm 0,08
Total n-6 PUFAs	20,41 \pm 0,33	29,79* \pm 0,84	18,45* \pm 0,25
Total n-3 PUFAs	12,54 \pm 0,21	4,83* \pm 0,34	15,36* \pm 0,47
n-6 : n-3 ratio	1,63 \pm 0,02	6,38* \pm 0,61	1,20* \pm 0,02

SFAs : Saturated fatty acids, MUFAs : monosaturated fatty acids, PUFAs : polyunsaturated fatty acids, DMAs : dimethyl acetals

➤ Comparaison des résultats obtenus chez les souriceaux mâles et femelles

Les analyses d'AG montrent que les régimes maternels LOW et HIGH modifient la composition lipidique de la MO des souriceaux mâles et femelles âgés de 3 semaines. Nous avons comparé les données obtenues afin d'identifier les différences entre les 2 sexes.

En ce qui concerne les AGS, on observe que la teneur totale de ces AG est significativement plus élevée dans la MO des mâles LOW (+24%) et HIGH (+24%) que dans la MO des femelles LOW et HIGH (**Tableau 7**). Les acides myristique (14:0), pentadécyclique (15:0) et palmitique (16:0) sont les AGS les plus affectés (respectivement x 6.8, x 1.5 et x 1.6 chez les mâles des groupes LOW et HIGH, par rapport aux teneurs de ces AGS des MO femelles). La teneur en acide arachidique (20:0) est quant à elle diminuée chez les mâles des groupes CON (-45%) et LOW (-25%) mais pas chez les mâles du groupe HIGH.

En ce qui concerne les AGPI, les régimes LOW et HIGH induisent des effets similaires dans la MO de la progéniture mâle et femelle, c'est-à-dire une augmentation des AGPI n-6 et des AGPI n-3 chez les souris des groupes LOW et HIGH, respectivement. Toutefois, chez les mâles, la modulation de ces AGPI par les régimes LOW et HIGH est moins marquée (par rapport au groupe CON, +46% d'AGPI n-6 et +22% d'AGPI n-3 dans les groupes LOW et HIGH mâles, respectivement) que chez les femelles (par rapport au groupe CON, +74% d'AGPI n-6 et +88% d'AGPI n-3 dans les groupes LOW et HIGH femelles, respectivement). Cet effet peut être associé à l'augmentation de la teneur en AGPI totaux observée chez les femelles des groupes LOW et HIGH.

Lorsque l'on examine plus en détail les différents AGPI, on observe que les teneurs en AA, DPA n-6, ALA, DPA n-3 et DHA sont plus faibles chez les mâles des groupes LOW et HIGH que chez les femelles. On note également une concentration moins importante d'ALA dans la MO des mâles du groupe CON.

Tableau 7 : Profil des acides gras de la muqueuse olfactive de souriceaux femelles et mâles âgés de 3 semaines, nés de mères sous régimes CON, LOW ou HIGH depuis la conception (n=6 souris/groupe). Les données représentent les moyennes \pm e.s.m. Le test non paramétrique de Mann Whitney a été utilisé pour comparer les données des groupes femelles à celles des groupes mâles ayant reçu le même régime. * $p < 0,05$.

Fatty acids	Female offspring' olfactory mucosa			Male offspring' olfactory mucosa		
	CON	LOW	HIGH	CON	LOW	HIGH
14:00	0.49 \pm 0.07	0.12 \pm 0.02	0.08 \pm 0.02	0,63 \pm 0,07	0,82* \pm 0,11	0,93* \pm 0,11
15:00	0.11 \pm 0.01	0.06 \pm 0.01	0.06 \pm 0.01	0,11 \pm 0,00	0,09* \pm 0,00	0,10* \pm 0,00
dma16:0	3.60 \pm 0.14	3.02 \pm 0.07	3.10 \pm 0.12	3,87 \pm 0,04	3,80* \pm 0,10	3,76* \pm 0,07
16:00	22.63 \pm 0.48	14.05 \pm 0.46	14.55 \pm 0.51	24,70* \pm 0,23	23,36* \pm 0,39	23,62* \pm 0,40
16:1n-9	0.42 \pm 0.02	0.27 \pm 0.01	0.25 \pm 0.01	0,56* \pm 0,01	0,54* \pm 0,01	0,44* \pm 0,01
16:1n-7	0.68 \pm 0.07	0.37 \pm 0.01	0.43 \pm 0.02	0,95* \pm 0,06	0,93* \pm 0,16	1,20* \pm 0,15
17:00	0.13 \pm 0.01	0.11 \pm 0.01	0.11 \pm 0.00	0,14 \pm 0,00	0,13* \pm 0,00	0,14* \pm 0,00
dma18:0	1.17 \pm 0.11	1.25 \pm 0.02	1.27 \pm 0.03	0,91* \pm 0,03	0,95* \pm 0,02	0,96* \pm 0,02
dma18:1n-9	0.70 \pm 0.06	0.71 \pm 0.01	0.73 \pm 0.04	0,57* \pm 0,02	0,60* \pm 0,02	0,56* \pm 0,02
dma18:1n-7	0.33 \pm 0.01	0.36 \pm 0.01	0.34 \pm 0.01	0,24* \pm 0,02	0,27* \pm 0,02	0,25* \pm 0,02
18:00	18.32 \pm 0.98	18.42 \pm 0.39	18.07 \pm 0.61	16,44 \pm 0,25	16,25* \pm 0,23	16,09* \pm 0,36
18:1t	0.09 \pm 0.04	0.06 \pm 0.00	0.04 \pm 0.00	0,07 \pm 0,00	0,06 \pm 0,00	0,05 \pm 0,00
18:1n-9	12.72 \pm 0.26	12.33 \pm 0.21	12.30 \pm 0.34	13,29 \pm 0,21	13,01 \pm 0,33	13,57* \pm 0,24
18:1n-7	2.76 \pm 0.24	2.99 \pm 0.06	2.87 \pm 0.09	2,79 \pm 0,06	2,81 \pm 0,04	2,64* \pm 0,04
18:2n-6	4.26 \pm 0.40	3.61 \pm 0.14	4.54 \pm 0.22	3,67 \pm 0,19	3,40 \pm 0,19	4,80 \pm 0,08
20:00	0.29 \pm 0.03	0.20 \pm 0.01	0.18 \pm 0.00	0,16* \pm 0,01	0,16* \pm 0,01	0,17 \pm 0,01
18:3n-6	0.12 \pm 0.01	0.09 \pm 0.01	0.11 \pm 0.00	0,10* \pm 0,00	0,09 \pm 0,00	0,10* \pm 0,00
20:1n-9	0.48 \pm 0.06	0.68 \pm 0.12	0.52 \pm 0.06	0,47 \pm 0,11	0,41* \pm 0,05	0,60 \pm 0,09
18:3n-3	0.16 \pm 0.01	0.11 \pm 0.01	0.14 \pm 0.01	0,04* \pm 0,01	0,02* \pm 0,00	0,06* \pm 0,01
20:1n-7	n.d \pm 0.0	n.d \pm 0.0	n.d \pm 0.0	0,07* \pm 0,01	0,06* \pm 0,01	0,07* \pm 0,01
20:2n-6	0.33 \pm 0.04	0.42 \pm 0.02	0.34 \pm 0.01	0,29 \pm 0,02	0,36 \pm 0,02	0,33 \pm 0,01
20:3n-9	0.37 \pm 0.06	0.54 \pm 0.07	0.31 \pm 0.01	0,38 \pm 0,02	0,39* \pm 0,02	0,24* \pm 0,01
22:00	0.36 \pm 0.06	0.15 \pm 0.01	0.16 \pm 0.01	0,13* \pm 0,02	0,17 \pm 0,03	0,19 \pm 0,03
20:3n-6	1.42 \pm 0.04	1.68 \pm 0.07	1.82 \pm 0.05	1,33 \pm 0,03	1,34* \pm 0,06	1,53* \pm 0,03
22:1n-9	1.47 \pm 0.14	1.78 \pm 0.08	1.96 \pm 0.31	0,14* \pm 0,01	0,13* \pm 0,01	0,13* \pm 0,01
20:4n-6	12.81 \pm 0.37	21.17 \pm 0.38	13.28 \pm 0.23	13,22 \pm 0,17	17,53* \pm 0,43	10,74* \pm 0,21
20:5n-3	0.54 \pm 0.03	0.19 \pm 0.01	1.89 \pm 0.09	0,55 \pm 0,02	0,15* \pm 0,00	1,35* \pm 0,05
24:00	0.56 \pm 0.15	0.18 \pm 0.01	0.26 \pm 0.02	0,20* \pm 0,01	0,19 \pm 0,01	0,22 \pm 0,02
24:1n-9	0.70 \pm 0.08	0.29 \pm 0.02	0.29 \pm 0.01	0,25* \pm 0,02	0,27 \pm 0,02	0,27 \pm 0,03
22:4n-6	1.17 \pm 0.04	2.75 \pm 0.05	1.02 \pm 0.03	1,29 \pm 0,03	2,35 \pm 0,13	0,82* \pm 0,03
22:5n-6	0.45 \pm 0.03	5.94 \pm 0.19	0.20 \pm 0.01	0,52 \pm 0,03	4,73* \pm 0,26	0,14* \pm 0,00
22:5n-3	0.55 \pm 0.02	0.20 \pm 0.00	1.18 \pm 0.04	0,57 \pm 0,02	0,16* \pm 0,01	1,00* \pm 0,04
22:6n-3	9.84 \pm 0.67	5.93 \pm 0.29	17.61 \pm 1.09	11,38 \pm 0,19	4,51* \pm 0,35	12,94* \pm 0,41
SFAs	42.88 \pm 0.96	33.28 \pm 0.86	33.46 \pm 0.71	42,52 \pm 0,41	41,12* \pm 0,52	41,45* \pm 0,53
MUFAs	19.32 \pm 0.51	18.76 \pm 0.37	18.65 \pm 0.56	18,57 \pm 0,33	18,21 \pm 0,58	18,96 \pm 0,47
PUFAs	32.01 \pm 1.13	42.62 \pm 0.89	42.44 \pm 1.24	33,33 \pm 0,49	35,01* \pm 0,58	34,05* \pm 0,71
DMAs	5.80 \pm 0.13	5.34 \pm 0.07	5.44 \pm 0.17	5,59 \pm 0,09	5,62 \pm 0,09	5,53 \pm 0,08
Total n-6 PUFAs	20.56 \pm 0.60	35.66 \pm 0.70	21.31 \pm 0.18	20,41 \pm 0,33	29,79* \pm 0,84	18,45* \pm 0,25
Total n-3 PUFAs	11.08 \pm 0.69	6.42 \pm 0.30	20.82 \pm 1.16	12,54 \pm 0,21	4,83* \pm 0,34	15,36* \pm 0,47
n-6/n-3 ratio	1.88 \pm 0.08	5.60 \pm 0.23	1.04 \pm 0.06	1,63 \pm 0,02	6,38 \pm 0,61	1,20* \pm 0,02

SFAs : Saturated fatty acids, MUFAs : monosaturated fatty acids, PUFAs : polyunsaturated fatty acids, DMAs : dimethyl acetals, n.d : not detected

- Interprétation

Ces études démontrent que les régimes déséquilibrés en AGPI n-3 administrés pendant la période périnatale modifient la composition en AG de la MO de la progéniture mâle et femelle. Chez les deux sexes, on observe des effets globalement similaires mais des différences existent.

La MO des mâles appartenant aux groupes LOW et HIGH se distingue par une teneur plus élevée en AGS et une teneur plus faible en AGPI par rapport à la MO de la progéniture femelle. Les principaux AGPI affectés sont, pour la série n-6, l'AA et le DPA n-6 et pour la série n-3, l'EPA, le DPA n-3 et le DHA. Ces données sont en accord avec la littérature. En effet, plusieurs études réalisées chez les rongeurs ont montré que la teneur en DHA dans le foie et le plasma est plus importante chez les rats femelles que chez les rats mâles et ce, quel que soit le régime alimentaire (Childs *et al.*, 2008). Comme évoqué plus haut, cette différence pourrait être due à l'influence des hormones sexuelles sur les enzymes impliquées dans la synthèse des AGPI-LC ou à des efficacités de β -oxydation, de stockage et de mobilisation des AGPI-LC différentes en fonction du sexe.

Cependant, on observe dans notre étude que les teneurs en AGPI, et notamment en DHA, des MO des souriceaux mâles et femelles du groupe CON sont équivalentes. Ceci paraît surprenant, d'autant plus que la teneur en ALA est nettement plus faible dans la MO des souris mâles. On peut émettre l'hypothèse qu'un régime alimentaire équilibré pourrait contribuer à réduire les variations entre sexe, contrairement aux régimes LOW et HIGH qui modulent différemment la composition en AG de la MO en fonction du genre.

En conclusion, pour s'affranchir de l'effet éventuel du genre sur la teneur en AGPI dans les tissus olfactifs, nous avons fait le choix de poursuivre nos études uniquement sur des individus mâles.

2. Impact des régimes déséquilibrés en AGPI n-3 sur les capacités olfactives des souriceaux

Plusieurs types de tests sont disponibles pour évaluer les capacités de détection olfactive chez les rongeurs : les tests qui permettent d'étudier l'activité spontanée de l'animal lors d'une stimulation olfactive et les tests qui nécessitent un entraînement préalable pour reconnaître des odeurs.

La première catégorie de test est relativement simple à mettre en œuvre. La réussite et les résultats du test reposent également sur la curiosité et la motivation de l'animal à explorer de nouvelles odeurs (Zou *et al.*, 2015). Un autre élément à prendre en compte pour la réussite du test est la familiarisation de l'animal avec le protocole expérimental (cage, dispositif expérimental, pièce) afin que la réponse mesurée ne soit pas une réponse de l'animal à la présentation ou découverte d'un nouvel environnement.

Plusieurs tests nécessitant un apprentissage ont été mis au point, comme le test go/no-go au cours duquel les animaux vont adapter leur comportement en fonction de l'odeur sentie (Frederick *et al.*, 2011). Nous avons fait le choix de ne pas utiliser de test olfactif nécessitant une phase d'apprentissage longue afin de pouvoir tester les capacités olfactives des animaux dès leur plus jeune âge (3 semaines).

Parmi les tests permettant d'évaluer l'activité olfactive spontanée, deux dispositifs expérimentaux peuvent être mis en œuvre assez facilement : une planche à trou sous laquelle est placée une source odorante et le test de flairage par pléthysmographie (Mandairon *et al.*, 2009; Hegoburu *et al.*, 2011). Le test de la planche à trou permet d'évaluer le temps d'exploration de l'animal en présence d'une source odorante par rapport à une source non odorante. Le test de flairage par pléthysmographie permet quant à lui, d'enregistrer la respiration de l'animal basée sur son réflexe naturel de flairage après la détection d'une odeur.

Pour la bonne réalisation du test de la planche à trou, une participation active de l'animal est nécessaire. Etant donné le jeune âge des souriceaux (3 semaines), nous avons choisi de réaliser le test de flairage par pléthysmographie. Ce test est moins anxiogène que celui de la planche à trou et il présente également l'avantage de ne pas nécessiter un niveau élevé de motivation pour détecter une stimulation odorante.

a. Matériels et Méthodes

- Dispositif expérimental du test de flairage par pléthysmographie

Le dispositif expérimental utilisé dans cette étude a été adapté des travaux de Hegoburu et collaborateurs (Hegoburu *et al.*, 2011). Le pléthysmographe (Emka Technologies, France) est composé de deux compartiments : la chambre de l'animal et la chambre de référence (**Figure 30**). Les parois de la chambre de l'animal contiennent des ports dont un est relié par un tube à un flacon contenant une solution odorante ou de l'eau distillée. La présence d'une valve au niveau du tube permet de dévier le flux d'air entrant et de faire pénétrer dans la chambre de l'air qui est au contact de la solution odorante. Les variations de pression induites par la respiration de l'animal sont mesurées grâce à un capteur différentiel de pression. Le signal enregistré est ensuite amplifié puis enregistré par le logiciel Axoscope (Axon Instruments, fréquence d'échantillonnage = 1 kHz).

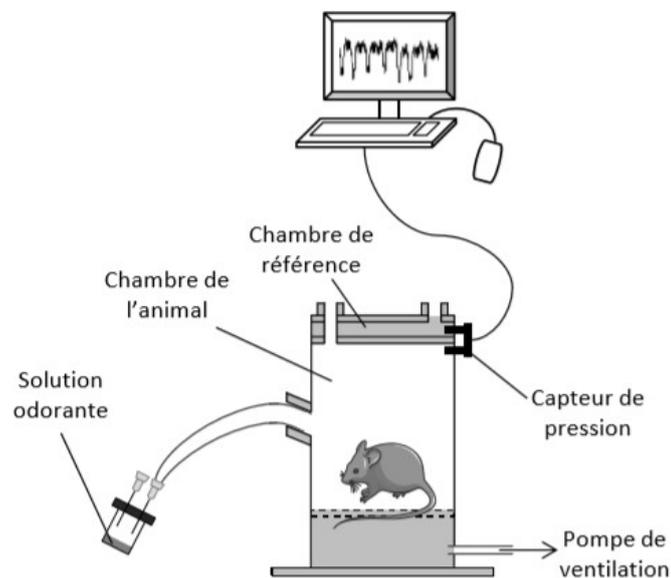


Figure 30 : Enregistrement de l'activité respiratoire des souris en réponse à des stimulations odorantes à l'aide d'un pléthysmographe. D'après Merle, 2018.

- Déroulement du test

La veille du test, chaque souris est introduite dans le pléthysmographe pendant 10 minutes et laissée libre dans la chambre. Pour accoutumer les animaux au flux d'air entrant, 6 à 10 stimulations (ouverture de valve) sont effectuées à partir d'un flacon contenant de l'eau distillée. Chaque stimulation dure 20 secondes et un laps de temps d'environ une minute est appliqué entre 2 stimulations.

Le jour du test, chaque souris est déposée dans la chambre de mesure et dispose de 5 minutes pour s'acclimater au dispositif expérimental. Avant de stimuler la souris avec une solution odorante, la respiration basale de la souris est enregistrée pendant 30 secondes. L'enregistrement de cette activité respiratoire basale est réalisé après s'être assuré que la souris est en état de repos, sans comportement de flairage excessif dû à l'exploration de la chambre. La première étape du test commence par une phase d'habituation au cours de laquelle la souris reçoit 3 à 6 stimulations d'une solution non odorante (eau distillée) afin de l'habituer au flux d'air entrant, puis la souris reçoit 2 stimulations successives de la solution odorante.

Pour réaliser ce test, nous avons choisi d'utiliser le PEA qui est considéré comme une odeur attractive pour la souris (Root *et al.*, 2014) . Il a été démontré que les souris passent plus de temps à investiguer une source odorante si celle-ci est perçue comme plaisante par rapport à une odeur considérée comme moins plaisante (Kobayakawa *et al.*, 2007; Mandairon *et al.*, 2009). Trois concentrations de PEA ($10^{-5}M$, $10^{-4} M$ et $10^{-3}M$) ont été testées afin d'établir les seuils de détection des souris des 3 groupes expérimentaux (CON, LOW et HIGH).

- Traitement du signal et extraction des données

Les enregistrements ont été analysés grâce à des routines écrites sous Matlab (Merle *et al.*, 2019). Les cycles respiratoires des souris ont été définis par les périodes de respiration basale et les périodes de stimulation odorante.

Nous avons analysé les signaux de la période de stimulation odorante et ceux de la période de respiration basale enregistrés en amont. Deux paramètres ont été mesurés sur chacune des périodes (**Figure 31**) :

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

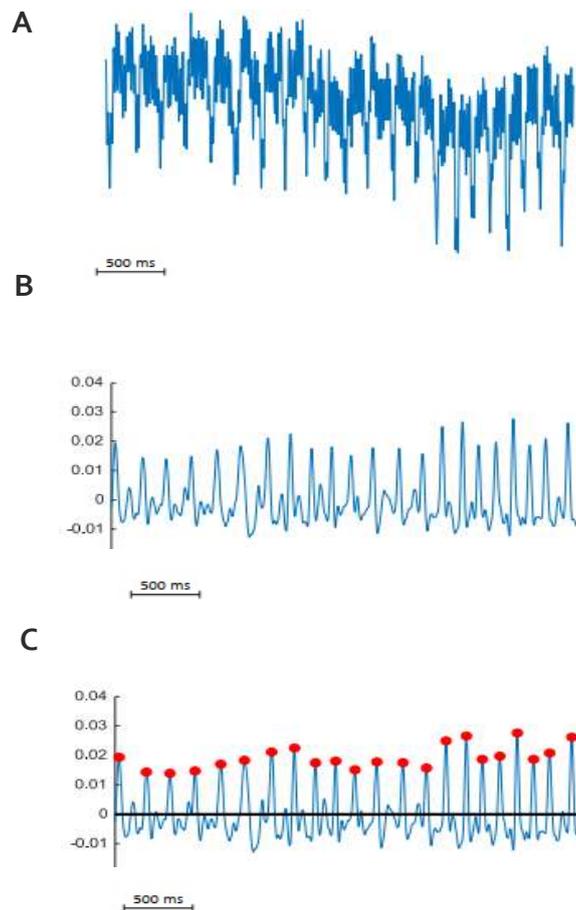


Figure 31 : Etapes de traitement des signaux obtenus par pléthysmographie. A : Signal brut. B : Signal filtré permettant de mettre en évidence les inspirations (pics vers le haut) et les expirations (pics vers le bas) par rapport à une ligne de base dont l'ordonnée est égale à zéro. C : Les point rouges identifient le maximum des inspirations effectuées par la souris. La distance entre chaque point rouge définit un cycle respiratoire composé d'une inspiration et d'une expiration. D'après Merle, 2018

Il a été montré que ces deux paramètres fluctuent en fonction du comportement de l'animal (Hegoburu *et al.*, 2011). En effet, la fréquence respiratoire de l'animal varie entre les phases de repos et d'exploration ($2 \pm 0,4$ Hz et $9,1 \pm 0,1$ Hz respectivement). Chez le rongeur, l'amplitude

d'inspiration, quant à elle, est également modulée par la présentation d'une odeur (Youngentob, 2005; Wesson *et al.*, 2008).

Les résultats obtenus sont présentés sous la forme d'un indice de flairage qui est calculé en intégrant les deux paramètres choisis (fréquence et amplitude) pendant la respiration basale et la stimulation odorante (PEA). Cet indice correspond à un z-score qui est utilisé pour normaliser les résultats d'études de phénotypage comportemental (Guilloux *et al.*, 2011). Ainsi, pour les mesures d'amplitude et de fréquence, les données brutes sont transformées par la formule : $z = ((x-\mu)/\sigma)$ où x représente la donnée brute mesurée (amplitude ou fréquence), μ la moyenne et σ l'écart-type de la condition de référence, c'est-à-dire la condition « respiration basale » du groupe CON. L'indice de flairage est ensuite calculé en réalisant la moyenne des deux z-scores (« z-fréquence » et « z-amplitude »).

- Analyses statistiques

Les résultats sont exprimés sous forme de moyennes \pm s.e.m. L'analyse statistique des données a été réalisée à l'aide du logiciel GraphPad Prism version 7. Une ANOVA à 2 facteurs (concentration, régime) sur mesures répétées suivie de tests post hoc de Bonferonni.

Ces expériences ont été réalisées par Laëtitia Merle, alors doctorante dans notre équipe.

b. Résultats

Ce test a été mis en œuvre pour évaluer le comportement de flairage en présence de PEA chez les souriceaux des groupes CON, LOW et HIGH. Le groupe CON a été utilisé comme groupe de référence pour calculer les indices de flairage (**Figure 32**).

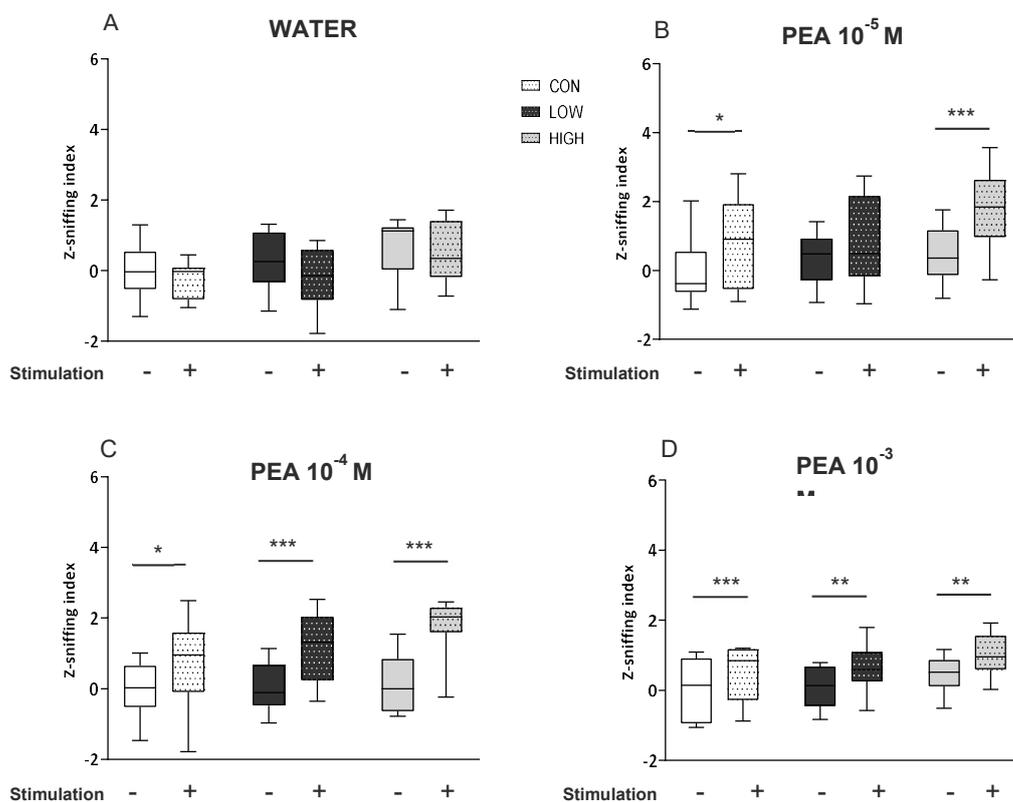


Figure 32 : Index de flairage des souris F1 mâles âgées de 3 semaines, stimulées par le phényléthyl alcool (PEA). Pré stim : indice de flairage avant la présentation du PEA ; stim : indice de flairage en présence de PEA. $n_{CON} = 10$ souris, $n_{LOW} = 13$ souris, $n_{HIGH} = 12$ souris. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ (ANOVA à 2 facteurs sur mesures répétées suivie de tests post-hoc de Bonferroni).

Dans un premier temps, nous avons vérifié qu'une stimulation non odorante (eau distillée) n'augmente pas l'activité respiratoire des 3 groupes d'animaux lors de la phase d'habituation (effet temps : $F(1,32) = 3,167$, $p = 0,057$) (**Figure 32A**).

Nous avons également vérifié que les paramètres de respiration basale (mesurés avant toute stimulation odorante) ne sont pas significativement différents entre les groupes CON, LOW et HIGH (effet groupe : $F(2,32) = 3,15$, $p = 0,056$ pour la stimulation à l'eau distillée ; $F(2,32) = 1,841$, $p = 0,17$), pour la stimulation avec du PEA à 10^{-5} M ; $F(2,32) = 1,391$, $p = 0,264$ pour la stimulation avec du PEA à 10^{-4} M ; $F(2,32) = 2,006$, $p = 0,151$ pour la stimulation avec du PEA à 10^{-3} M) (**Figures 32B,C et D**).

Lors de la présentation du PEA à 10^{-5} M (**Figure 32 B**), les souriceaux du groupes CON et HIGH augmentent leur flairage en réponse à la stimulation (effet temps : $F(1,32) = 33,41$, $p < 0,001$; tests post-hoc période basale vs stimulation odorante : CON : $t = 2,878$, $p < 0,05$, LOW : $t = 2,325$, $p > 0,05$, HIGH : $t = 4,828$, $p < 0,001$). Ces résultats signifient que les souriceaux du groupe CON et HIGH détectent le PEA à cette concentration. Par contre, les souriceaux du groupe LOW ne modifient pas leur flairage, ce qui indique que ces animaux ne perçoivent pas l'odeur de PEA. Lors de la stimulation avec 10^{-4} M de PEA, les souriceaux LOW modifient à leur tour leur flairage, signifiant que les souriceaux LOW détectent la présence de PEA à cette concentration tout comme les animaux des groupes CON et HIGH (**Figure 32C**). A la concentration de 10^{-3} M, les souriceaux CON, LOW et HIGH perçoivent tous la présence de PEA (**Figure 32 D**) (effet temps : $F(1,32) = 80,97$, $p < 0,001$; tests post-hoc période basale vs stimulation odorante : CON : $t = 2,823$, $p < 0,05$, LOW : $t = 5,501$, $p > 0,001$, HIGH : $t = 7,525$, $p < 0,001$).

Cette étude met en évidence que le seuil de détection du PEA des souriceaux nés de mères exposées au régime LOW est plus élevé que celui des animaux du groupe contrôle : ils détectent la présence de PEA à une concentration 10 fois supérieure à celle des souriceaux CON. Ce résultat suggère qu'un régime maternel déficient en AGPI n-3 altère la perception olfactive des souriceaux âgés de 3 semaines.

Afin d'évaluer si cette perturbation olfactive résulte de modifications physiologiques au niveau du système olfactif périphérique, nous avons étudié les réponses électrophysiologiques de la MO à des odorants en réalisant des enregistrements d'électro-olfactogrammes. Nous avons également analysé l'impact des régimes déséquilibrés en AGPI n-3 sur l'expression de gènes impliqués dans différents mécanismes cellulaires, notamment la cascade de transduction du signal olfactif.

3. Impact des régimes déséquilibrés en AGPI n-3 sur la sensibilité de la muqueuse olfactive

Des enregistrements d'électro-olfactogrammes (EOG) ont été réalisés sur les MO des petits F1 mâles âgés de 3 semaines afin de rechercher si les régimes LOW et HIGH ont un impact sur la réponse des neurones olfactifs aux odorants.

Cette méthode consiste à enregistrer l'activité électrique extracellulaire de l'épithélium olfactif en réponse à une stimulation odorante. L'activité électrique enregistrée correspond à la somme des potentiels générateurs d'une population de neurones olfactifs activés par un odorant. Cette technique mesure donc la réponse globale d'une population de neurones olfactifs présents à proximité de l'électrode d'enregistrement. L'amplitude de la réponse varie en fonction de la concentration du stimulus et reflète à la fois le nombre de neurones activés mais aussi la réponse individuelle des neurones activés en réponse à ce stimulus.

a. Matériels et Méthodes

- Dispositif expérimental

Le dispositif expérimental d'enregistrement d'EOG utilisé au laboratoire est similaire à celui mis en oeuvre par Cygnar et al. (Cygnar *et al.*, 2010) (**Figure 33**).

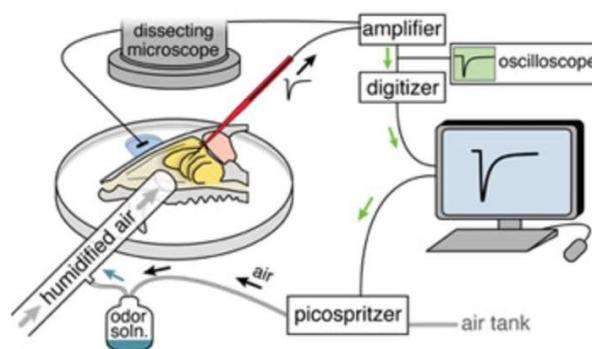


Figure 33 : Système d'enregistrement d'électro-olfactogrammes (EOG). D'après Cygnar *et al.*, 2010.

Le poste d'EOG comprend :

- Une chambre d'enregistrement placée sous une loupe binoculaire afin de positionner l'hémi-tête correctement.
- Un flux constant d'air humidifié (~1L/min) délivré à 2 cm du tissu via un tube en téflon ; une pipette Pasteur en verre contenant un papier filtre imprégné de solution odorante (10 µL) est insérée dans le tube en téflon. Le stimulus est déclenché sous l'impulsion d'une picopompe.
- Une électrode de référence positionnée sur le BO, composée d'un fil d'argent préalablement chloruré et recouverte d'une fine pellicule de gel conducteur (Signagel, Parker Lab.).
- Une électrode d'enregistrement positionnée sur la MO, constituée également d'un fil d'argent chloruré et disposée dans une micropipette de verre préalablement 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 NaCH_3SO_4 , 1 mM de MgSO_4 , 5 mM de CaCl_2 , 10 mM d'HEPES, 11 mM de glucose, 50 mM de mannitol. Le pH de cette solution est ajusté à 7,4 et l'osmolarité à 350 mOsm par ajout de mannitol.
- Un amplificateur (Axoclamp 200B, Axon Instruments) en configuration current-clamp $I = 0$.
- Un convertisseur (Digidata 1440, Axon Instruments) permettant de convertir le signal analogique en signal numérique avec une fréquence d'échantillonnage de 1 kHz et un filtre passe bas à 300Hz.
- Un ordinateur équipé du logiciel Axoscope (Axon Instruments, Molecular Devices).

- Préparation des odorants

Pour réaliser ce test fonctionnel, deux odorants, le phényléthyl alcool (PEA) et l'acétophénone (ACE) ont été utilisés (**Figure 34**). A priori, les odeurs de ces 2 molécules sont perçues sans

connotation alimentaire par les souris. Ces deux odorants sont décrits comme ayant une odeur florale pour l'Homme ("The Good Scents Company, "). Le PEA possède une odeur de rose et l'ACE possède une odeur d'amande amère. Avant chaque expérience, les solutions odorantes de concentrations allant de 10^{-1} M à 10^{-6} M sont préparées dans de l'eau distillée à partir d'une solution stock de chaque odorant à 0.5 M dans du diméthylsulfoxyde (DMSO).

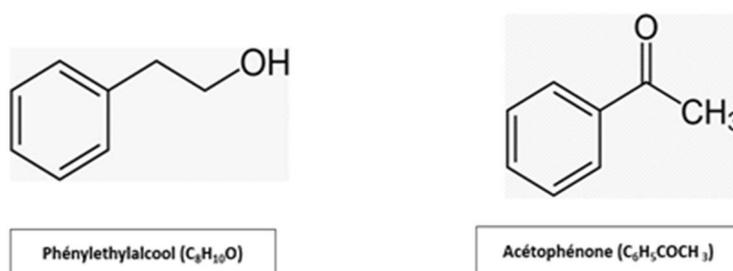


Figure 34 : Structures du phényléthylalcool (PEA) et de l'acétophénone (ACE).

- Préparation du tissu et enregistrement

Après anesthésie à l'aide d'un mélange kétamine/xylazine (respectivement 150 mg/kg p.c. et 10 mg/kg p.c.), les souris sont sacrifiées par décapitation. Une section de la tête au niveau de la cloison septale permet d'obtenir deux héli-têtes dévoilant les cornets olfactifs de chaque côté. Après s'être assuré que l'épithélium olfactif est intact, l'héli-tête est déposée dans la chambre d'enregistrement. Le flux d'air et les électrodes sont ensuite positionnés sur le set-up. Les pipettes Pasteur contenant les papiers filtres imprégnés par les différentes concentrations des odorants sont préparées. Les enregistrements sont réalisés en positionnant l'électrode d'enregistrement au niveau du cornet III. Les stimulations sont réalisées en propulsant de l'air (200 ms à 1 psi) à l'intérieur de la pipette Pasteur. Dans un premier temps, une stimulation avec une pipette Pasteur contenant un papier filtre imprégné d'eau distillée est réalisée pour mesurer la réponse mécanique de la MO en l'absence d'odorant. On stimule ensuite la MO avec les solutions de concentrations croissantes de PEA et d'ACE. Chaque stimulation est séparée par un laps de temps d'une minute. De nouvelles pipettes Pasteur sont préparées pour chaque individu.

- Analyse des résultats

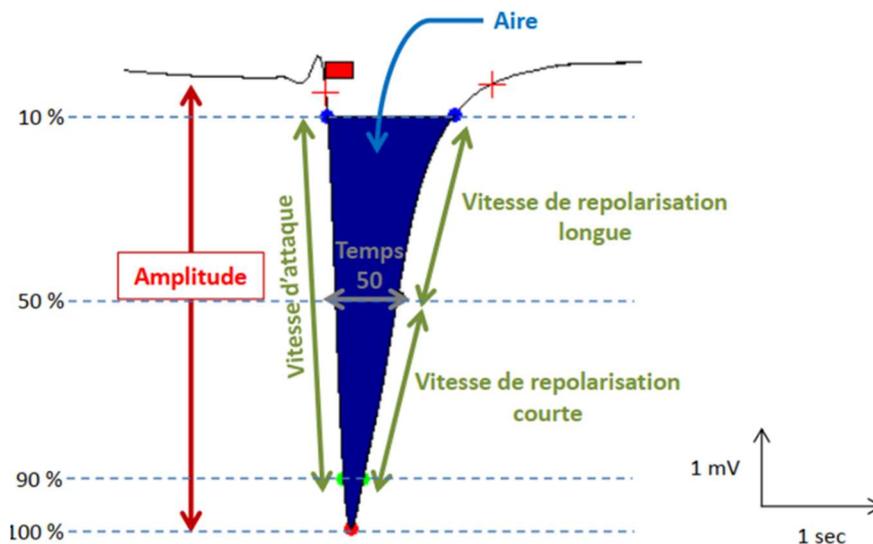


Figure 35 : Schéma présentant les paramètres extraits des enregistrements d'EOG. D'après Merle, 2018

Les enregistrements obtenus sont analysés grâce à des routines écrites sous Matlab. Les algorithmes mesurent plusieurs paramètres de la réponse odorante (Merle *et al.*, 2019) :

- L'amplitude du signal, qui dépend du nombre de neurones activés par l'odorant et de leur degré de réponse individuelle. C'est le principal paramètre retenu pour présenter des résultats d'EOG.
- La vitesse d'attaque, qui correspond à la pente du signal pour passer de 10% à 90% de l'amplitude. Ce paramètre dépend également du nombre de NSO activés ainsi que de leur temps de latence.
- Les vitesses de repolarisation courte (pente de la courbe pour revenir de 90 % à 50 % de l'amplitude) et longue (pente de la courbe pour revenir de 50 % à 10 %). Elles sont le reflet de la terminaison du signal olfactif au sein des NSO. Elles dépendent des mécanismes de dégradation et d'élimination des odorants mis en œuvre dans les NSO et le mucus.

- L'aire reflète l'ensemble de ces paramètres. Elle représente à la fois la dépoliarisation totale ou l'intensité globale d'activation de l'épithélium olfactif.

- Analyses statistiques

Les résultats sont exprimés sous forme de moyennes \pm sem. L'analyse statistique des données a été réalisée à l'aide du logiciel GraphPad Prism version 7. Une ANOVA à 2 facteurs (concentration, régime) sur mesures répétées suivie du test post hoc Bonferonni ont été réalisés. Un seuil de significativité de 0.05 a été appliqué.

Ces expériences ont été réalisées par Laetitia Merle, David Jarriault et Anne Marie Le Bon.

b. Résultats

Les résultats obtenus montrent que l'amplitude des signaux EOG en réponse à des stimulations croissantes de PEA et d'ACE n'est pas affectée par les régimes maternels LOW et HIGH (**Figure 36A**). Les caractéristiques cinétiques des réponses ne sont également pas modifiées (**Figures 36B, C et D**). Cette étude indique que les régimes maternels LOW et HIGH ne perturbent pas la sensibilité de l'épithélium olfactif des souriceaux âgés de 3 semaines.

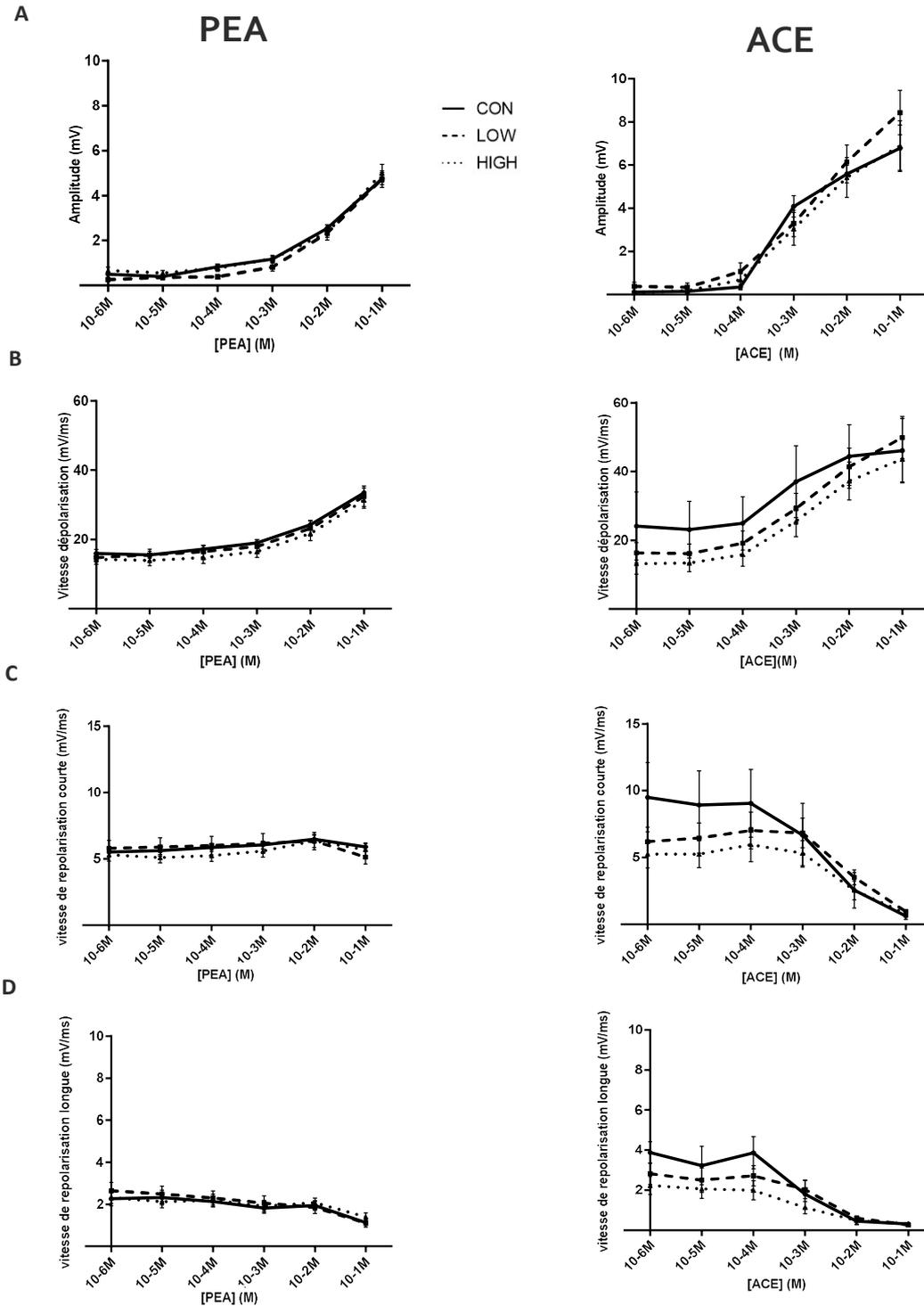


Figure 36 : Données obtenues par EOG chez les souris F1♂ âgées de 3 semaines. (A) Amplitudes des signaux EOG enregistrés suite à une stimulation par des concentrations croissantes de PEA ou d'ACE. (B), (C) et (D) Caractéristiques des cinétiques de réponses enregistrées. Les données représentent les moyennes \pm sem. Pour le PEA, $n_{CON} = 28$, $n_{LOW} = 17$ et $n_{HIGH} = 23$; pour l'ACE, $n_{CON} = 3$, $n_{LOW} = 14$ et $n_{HIGH} = 7$. Aucune différence significative n'a été observée (ANOVA à 2 facteurs sur mesures répétées suivie de tests post hoc Bonferonni, $p < 0.05$).

4. Impact des régimes sur l'expression de gènes dans la muqueuse olfactive des souriceaux âgés de 3 semaines

Cette étude moléculaire avait pour but d'étudier, au sein de la muqueuse olfactive de souriceaux mâles âgés de 3 semaines, l'impact de régimes déséquilibrés en AGPI n-3 sur l'expression de gènes impliqués dans différents mécanismes cellulaires.

Dans chaque groupe expérimental (n= 8 souris/groupe), nous avons quantifié les ARN messagers codant pour :

- des éléments de la cascade de transduction du signal olfactif périphérique
- des facteurs de transcription et des marqueurs spécifiques de la neurogénèse et de la différenciation neuronale
- des éléments impliqués dans le métabolisme des lipides
- des transporteurs impliqués dans l'homéostasie des cellules de la muqueuse olfactive
- des éléments impliqués dans l'inflammation et sa résolution

a. Matériels et Méthodes

- Prélèvement de la muqueuse olfactive

Après anesthésie à l'aide d'un mélange kétamine/xylazine (respectivement 150 mg/kg p.c. et 10 mg/kg p.c.), les souris mâles âgées de 3 semaines ont été sacrifiées par décapitation. Après avoir ôté la peau recouvrant la tête, cette dernière est disséquée afin de pouvoir prélever la muqueuse olfactive (MO) recouvrant la cloison septale et les cornets (**Figure 37**).

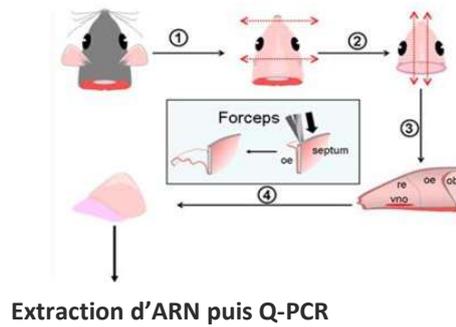


Figure 37 : Procédure de prélèvement du tissu olfactif périphérique. vomeronasal organ (vno), respiratory epithelium (re), olfactory epithelium (oe), olfactory bulb (ob). D'après Aoudé, 2012.

- Extraction des ARN totaux et transcription inverse

Les MO sont rapidement transférées dans l'azote liquide puis stockés à -80°C en attendant de réaliser l'extraction des ARNm. Après broyage des tissus à l'aide d'un Tissue Lyser™, (Qia-gen, 2x2 min à 25 Hz), les ARN totaux sont extraits à l'aide d'un kit commercial (Nucleospin RNA plus kit, Macherey-Nagel). La quantité et la qualité des ARN sont mesurées à l'aide de puces Expérian (Biorad) et seuls les ARN présentant un indicateur de qualité ou RQI > 8 ont été utilisés. Les ADNc ont ensuite été synthétisés par transcription inverse à partir de 1 μg d'ARN à l'aide du kit PrimeScript™ RT reagent kit (Takara). Les ADNc sont ensuite stockés à -20°C en attendant de réaliser la PCR quantitative.

- PCR quantitative (Q-PCR)

La Q-PCR est réalisée à partir de 50 ng d'ADNc auxquels sont ajoutés les amorces du gène d'intérêt (250 nM) et un mélange réactionnel contenant du SYBR Green Master Mix (Life Technologies). La Q-PCR est effectuée dans un thermocycleur StepOne (Thermofisher Scientific, Applied Biosystem) pendant 40 cycles comprenant 3 secondes à 95°C et 30 secondes à 60°C .

Tableau 8 : Liste des gènes de référence et d'intérêt quantifiés par Q-PCR.

SYMBOLE	NOM DU GENE	N° ENSEMBL	
Hprt	Hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase	ENSMUSG00000025630.9	} Gènes de référence
Gapdh	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	ENSMUSG00000057666.19	
Sox2	SRY (sex determining region Y)-box 2	ENSMUSG00000074637.7	
Neurog1	Neurogenin 1	ENSMUSG00000048904.5	} Neurogénèse et différenciation neuronale
Neurod1	Neurogenic differentiation 1	ENSMUSG00000034701.9	
Tubb3	Tubulin, beta 3 class III	ENSMUSG00000062380.5	
Gap43	Growth associated protein 43	ENSMUSG00000047261.9	
Omp	Olfactory marker protein	ENSMUSG00000074006.3	
Mor 23	Mouse olfactory receptor 16	ENSMUSG00000037924	} Récepteurs olfactifs
Mor 28	Mouse olfactory receptor 1507	ENSMUSG00000059887	
Mor 246	Mouse olfactory receptor 725	ENSMUSG00000068437	
GOLFa	Guanine nucleotide binding protein, alpha stimulating, olfactory type	ENSMUSG00000024524.17	} Sous-unités de la protéine G et protéines chaperonnes
Gnb1	Guanine nucleotide binding protein (G protein), beta 1	ENSMUSG00000029064.15	
Gng8	Guanine nucleotide binding protein (G protein), gamma 8	ENSMUSG00000063594.5	
Gng13	Guanine nucleotide binding protein (G protein), gamma 13	ENSMUSG00000025739.14	
Rtp1	Receptor transporter protein 1	ENSMUSG00000033383.6	
Rtp2	Receptor transporter protein 2	ENSMUSG00000047531.9	
Ac3	Adenylate cyclase 3	ENSMUSG00000020654.15	
Cnga2	Cyclic nucleotide gated channel alpha 2	ENSMUSG00000005864.7	} Cascade de transduction et terminaison du signal olfactif
Ano2	Anoctamin 2	ENSMUSG00000038115.16	
Pde1c	Phosphodiesterase 1C	ENSMUSG00000004347.17	
CamkII	Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II	ENSMUSG00000053819.16	
Grk3	G protein-coupled receptor kinase 3	ENSMUSG00000042249.11	
Cd36	Fatty acid translocase	ENSMUSG00000002944.15	} Métabolisme des lipides
Pla2g4a	Phospholipase A2, group IVA	ENSMUSG00000056220.14	
Pla2g6	Phospholipase A2, group VI	ENSMUSG00000042632.17	
Plcb4	Phospholipase C, beta 4	ENSMUSG00000039943.16	
Lpcat3	Lysophosphatidylcholine acyltransferase 3	ENSMUSG00000004270.13	
Agpat4	Acylglycerophosphate acyltransferase 4	ENSMUSG00000023827.9	} Transporteurs impliqués dans l'homéostasie cellulaire
Abca13	ATP-binding cassette, sub-family A (ABC1), member	ENSMUSG00000004668.14	
Slc2a1 (Glut1)	Solute carrier family 2	ENSMUSG00000028645.11	
Slc5a1 (Sgt1)	Solute carrier family 5	ENSMUSG00000011034.6	
Slc24a2	Solute carrier family 24 member 2	ENSMUSG00000037996.17	
Slc24a4	Solute carrier family 24 member 4	ENSMUSG00000041771.14	} Inflammation et résolution de l'inflammation
Il6	Interleukin 6	ENSMUSG00000025746.11	
Il1b	Interleukin 1 beta	ENSMUSG00000027398.13	
Tnf alpha	Tumor necrosis factor alpha	ENSMUSG00000024401.14	
Il10	Interleukin 10	ENSMUSG00000016529.5	
IL13	Interleukin 13	ENSMUSG00000020383.1	

Les amorces ont été dessinées à l'aide du logiciel Primer Blast et leur efficacité vérifiée avant de réaliser les quantifications. Seuls les couples d'amorces affichant des efficacités comprises entre 90 et 100% ont été sélectionnés pour les analyses.

Les gènes étudiés sont présentés dans le **Tableau 8**. L'expression de deux gènes s'exprimant de manière stable dans nos conditions expérimentales (gènes de référence Hprt et Gapdh) a également été mesurée pour permettre la quantification de l'expression des gènes d'intérêt.

- Quantification

Les résultats obtenus sont exprimés en Ct puis normalisés avec la méthode du $2^{-\Delta\Delta Ct}$ qui permet à la fois de normaliser les résultats par rapport aux gènes de référence et par rapport au groupe contrôle CON (Pfaffl, 2001). Les résultats sont exprimés sous la forme d'un ratio d'expression appelé R (quand $R = 1$, l'expression du gène d'intérêt n'est pas modulée, quand $R < 1$, le gène d'intérêt est sous exprimé et quand $R > 1$, le gène d'intérêt est surexprimé).

- Analyse statistique

Les données ont été analysées à l'aide du test non paramétrique de Mann Whitney. Les données des groupes LOW et HIGH ont été comparées aux données issues du groupe CON. Un seuil de significativité de 0.05 a été appliqué.

b. Résultats

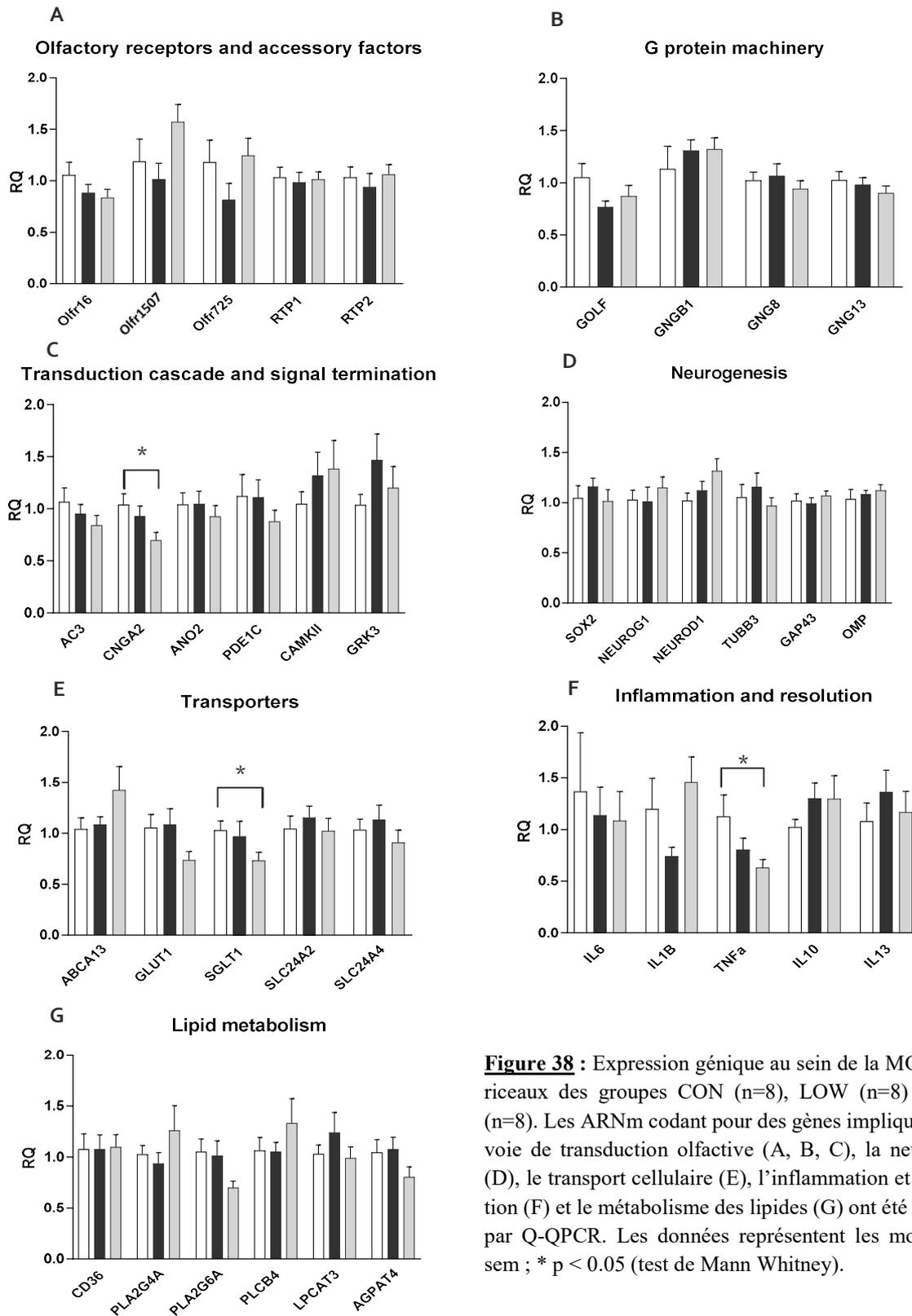


Figure 38 : Expression génique au sein de la MO des souris des groupes CON (n=8), LOW (n=8) et HIGH (n=8). Les ARNm codant pour des gènes impliqués dans la voie de transduction olfactive (A, B, C), la neurogénèse (D), le transport cellulaire (E), l'inflammation et la résolution (F) et le métabolisme des lipides (G) ont été quantifiés par Q-QPCR. Les données représentent les moyennes ± sem ; * p < 0.05 (test de Mann Whitney).

Les résultats présentés dans la **Figure 38** montrent que le régime HIGH diminue l'expression de la sous unité A2 du canal ionique CNG impliqué dans la transduction du signal olfactif ($p=0.02$). L'expression du gène codant pour SGLT1 (Slc5a1), une protéine impliquée dans le transport du glucose, ainsi que l'expression du gène TNF- α , un marqueur de l'inflammation, sont également diminuées dans la MO des souriceaux du groupe HIGH ($p=0.038$ et $p=0.046$, respectivement). Le régime HIGH n'affecte pas l'expression des gènes impliqués dans la neurogenèse, le fonctionnement des ROs et le métabolisme des lipides que nous avons étudiés. Le régime LOW ne modifie pas l'expression des gènes étudiés.

5. Bilan des effets observés chez les souriceaux âgés de 3 semaines

Ces études avaient pour but d'évaluer les répercussions de régimes maternels déficient (LOW) ou enrichi (HIGH) en AGPI n-3 sur la composition en AG de la MO de la progéniture mâle et femelle au moment du sevrage et sur la fonctionnalité du système olfactif.

Nos résultats montrent que la distribution des AG dans la MO des souriceaux dont les mères ont consommé un régime déficient ou enrichi en AGPI n-3 est modifiée dès l'âge de 3 semaines. Le régime LOW entraîne une augmentation de la teneur en AGPI de la série n-6 et une diminution de la teneur en AGPI de la série n-3 dans la MO des souriceaux tandis que le régime HIGH produit des effets inverses (augmentation des AGPI n-3 et réduction des AGPI n-6). Ces modifications ont été observées à la fois chez la progéniture mâle et femelle. Cependant, les modulations sont plus marquées chez les souriceaux femelles que chez les mâles. Pour s'affranchir des effets associés aux hormones sexuelles, nous avons choisi de poursuivre nos travaux avec les souriceaux mâles.

Etant donné l'importance d'un apport adéquat en AGPI n-3 pendant la période périnatale sur le développement des tissus neuronaux, nous avons émis l'hypothèse que les modifications observées pourraient avoir des conséquences sur la fonction olfactive des souriceaux.

A l'aide du dispositif de pléthysmographie qui permet de mesurer l'activité de flairage induite par une odeur, nous avons mis en évidence une altération de la capacité de détection des odeurs chez les souriceaux du groupe LOW. Chez ces animaux, le seuil de détection du PEA est significativement plus élevé que chez les animaux contrôles. Une alimentation maternelle déficiente en APGI n-3 pendant la gestation et la lactation impacte donc le comportement olfactif de la progéniture à l'âge de 3 semaines.

Pour savoir si cette altération du comportement olfactif chez les souriceaux du groupe LOW résulte de perturbations fonctionnelles au niveau du système olfactif périphérique, nous avons mesuré *ex vivo* la réponse de la MO à des stimulations odorantes. Les enregistrements d'EOG n'ont révélé aucun effet du régime déficient en AGPI n-3 sur la fonctionnalité de la MO des souriceaux. Ce régime n'affecte pas non plus l'expression des principaux éléments de la cascade de transduction olfactive dans la MO, ce qui est cohérent avec les résultats de l'approche EOG. Nous émettons donc l'hypothèse que les perturbations du comportement olfactif de la

progéniture du groupe LOW proviendraient majoritairement de dysfonctionnements dans le traitement central de l'information olfactive.

Nos travaux indiquent par ailleurs que le comportement de flairage des souriceaux du groupe HIGH ne diffère pas de celui des animaux du groupe contrôle. Les réponses ex-vivo de la MO à des odorants ne sont également pas modifiées chez les souriceaux de ce groupe. Ce dernier résultat est un peu surprenant car nous avons observé que le régime maternel enrichi en AGPI n-3 diminue l'expression génique de CNGA2, un élément des canaux CNG qui permettent l'entrée des ions Na⁺ et Ca²⁺ dans la cellule après l'initiation du signal olfactif. L'augmentation de Ca²⁺ intracellulaire provoque la dépolarisation de la membrane à l'origine de la production de potentiels d'action. Une diminution de l'expression de CNGA2 pourrait de ce fait affecter le fonctionnement des NSOs. Comme ce n'est pas le cas, on peut supposer que cette modification n'est pas suffisante pour observer une altération des réponses EOG. D'autres mécanismes impliqués dans le transport ionique permettent peut-être de compenser la réduction de CNGA2.

Au cours de ce travail, nous avons également examiné l'impact des régimes déséquilibrée en AGPI n-3 sur l'expression de gènes impliqués dans différentes voies cellulaires au niveau de la MO. Nous avons notamment évalué l'expression de gènes impliqués dans les processus inflammatoires car de nombreuses études ont mis en évidence un effet bénéfique de l'apport nutritionnel en AGPI n-3 sur l'inflammation, en particulier dans le cerveau (Joffre *et al.*, 2019). On observe que le régime maternel HIGH induit une diminution significative de l'expression du gène codant pour TNF-alpha, une cytokine pro-inflammatoire. Ce résultat suggère que ce régime pourrait avoir un effet anti-inflammatoire (ou protecteur) au niveau de la MO des souriceaux.

Nous nous sommes aussi intéressés aux gènes impliqués dans le transport cellulaire, en particulier dans le transport du glucose. Le glucose est utilisé comme source d'énergie par les neurones pour assurer différentes fonctions comme la neurotransmission. Plusieurs transporteurs du glucose ont été identifiés dans la MO de souris, dont GLUT 1 (Palouzier-Paulignan *et al.*, 2012; Ibarra-Soria *et al.*, 2014) et SGLT1 (Kanageswaran *et al.*, 2015). Dans notre étude, on observe que le niveau d'expression de l'ARNm codant pour SGLT1 dans la MO diminue chez les souriceaux soumis à une alimentation maternelle enrichie en AGPI n-3. Ce résultat suggère

que le transport du glucose via le transporteur SGLT1 pourrait être perturbé dans la MO des souriceaux HIGH. Ce résultat est surprenant car des études ont montré qu'une supplémentation en AGPI-LC tels que l'EPA et le DHA favorise plutôt le transport basal du glucose dans les cellules endothéliales du cerveau de rats (Pifferi *et al.*, 2010).

En conclusion, cette étude montre qu'un régime maternel déficient en AGPI n-3 perturbe les capacités olfactives des souriceaux âgés de 3 semaines mais cet effet ne semble pas reposer sur une altération physiologique de la MO. Le régime maternel enrichi en AGPI n-3 à longues chaînes module l'expression de quelques gènes dans la MO des souriceaux mais ne modifie pas leurs capacités olfactives.

Ces effets ont été observés chez des souriceaux exposés aux régimes déséquilibrés pendant les périodes de gestation et de lactation. Dans la suite de ce projet de thèse, nous avons souhaité évaluer l'impact de ces régimes chez la progéniture âgée de 8 semaines, c'est-à-dire chez des petits exposés aux régimes via l'alimentation maternelle et ayant consommé eux-mêmes ces régimes pendant 5 semaines.

ETUDE n°2

*Impact des régimes maternels déséquilibrés
en AGPI n-3 sur la physiologie du système olfactif pé-
riphérique de la progéniture à l'âge adulte*

1. Impact de régimes maternels déséquilibrés en AGPI n-3 sur la physiologie de la MO des souris adultes (8 semaines)

Les résultats de l'étude réalisée chez les souriceaux à l'âge de 3 semaines ne mettent pas en évidence d'effets majeurs des régimes maternels déséquilibrés en AGPI n-3 sur la physiologie du système olfactif périphérique.

A la naissance, le système olfactif périphérique est immature. La surface totale de l'EO et le volume total des BO est multipliée par 10 entre la naissance et l'âge adulte (10-12 semaines) chez les rongeurs. Pendant cette période de maturation, les circuits neuronaux se développent et se complexifient, le nombre de glomérules augmente tout comme le nombre de synapses glomérulaires et extraglomérulaires sans suppression apparente de la population initiale ((Pomeroy *et al.*, 1990)

Notre objectif étant d'évaluer les effets des régimes déséquilibrés en AGPI n-3 sur les tissus olfactifs pendant la période de développement, nous avons choisi d'exposer la progéniture aux régimes CON, LOW et HIGH les périodes de lactation-gestation puis pendant 5 semaines supplémentaires et d'évaluer l'impact de ces régimes sur les mêmes cibles que celles étudiées chez les souriceaux âgés de 3 semaines. Nous avons ainsi analysé, chez les souris âgées de 8 semaines, la composition en AG de la MO et des cils olfactifs, l'expression de différents acteurs impliqués dans la transduction du signal olfactif périphérique et le métabolisme cellulaire, la sensibilité olfactive de la MO et leurs capacités olfactives.

a. Article Soubeyre *et al.*, (soumis à Nutritional Neuroscience) :

L'analyse des AG montre que les régimes déséquilibrés en AGPI n-3 modifient les teneurs en AGPI des séries n-3 et n-6 dans la MO des souris. Comme observé à l'âge de 3 semaines, le régime LOW provoque une augmentation importante de la teneur en AGPI n-6 et une nette diminution de la teneur en AGPI n-3. Les teneurs en AA et DPA n-6 sont les plus affectées, tout comme celles en EPA, DPA n-3 et DHA. La diminution de la teneur en DHA est partiellement compensée par une augmentation de la teneur en DPA n-6. Le régime HIGH induit, quant

à lui, des effets inverses (augmentation des AGPI n-3 et diminution des AGPI n-6) et plus modérés.

La composition en AG des cils olfactifs a également été étudiée dans cette étude car les principaux acteurs impliqués dans la détection et la transduction du signal olfactif sont localisés dans ce compartiment cellulaire. Les résultats indiquent que les cils contiennent plus d'AGS et moins d'AGPI que la MO. Le faible nombre d'échantillons analysés n'a pas permis de mettre en évidence des effets significatifs des régimes LOW et HIGH sur la composition de la membrane des cils. Toutefois, on peut noter que le régime LOW tend à augmenter la teneur en AGPI n-6 des cils au détriment des AGS et des AGPI n-3 ainsi que l'index d'insaturation. Ces effets sont cohérents avec l'augmentation de l'anisotropie de la fluorescence mesurée dans les cils du groupe LOW, qui suggère que le régime LOW diminuerait la fluidité membranaire des cils olfactifs.

Par ailleurs, nos résultats démontrent qu'une alimentation déséquilibrée en AGPI n-3 perturbe le cytosquelette des NSO. En effet, les régimes LOW et HIGH diminuent l'expression de TUBB3, une protéine impliquée dans la formation des microtubules présents dans les corps cellulaires et les axones des neurones. De plus, on observe que le régime LOW provoque une diminution de l'expression de l'OMP, un marqueur spécifique des NSO matures. Ces résultats suggèrent que les régimes déséquilibrés en AGPI n-3 perturbent la maturation des NSO.

L'analyse fonctionnelle par EOG montre qu'une alimentation déficiente en AGPI n-3 diminue la sensibilité de la MO des souris âgées de 8 semaines. Le régime LOW diminue à la fois l'amplitude et les cinétiques de réponse des NSO après une stimulation odorante ainsi que l'expression de certains acteurs de la cascade de transduction du signal (OMP, PDE1C et RTP2). Des études récentes confèrent à OMP un rôle dans la cascade de transduction du signal olfactif : OMP interagirait avec l'AMPC et/ou l'ACIII et modulerait ainsi la cinétique de l'AMPC. PDE1C est une enzyme qui serait impliquée dans les processus d'adaptation des NSO. RTP2 est une protéine chaperone qui participe à l'adressage des RO à la membrane. L'ensemble de ces altérations moléculaires pourrait expliquer la diminution de la sensibilité aux odorants observée dans le groupe LOW.

De manière surprenante, les analyses comportementales ne mettent pas en évidence de troubles de la détection et de la discrimination des odeurs dans les groupes LOW et HIGH. Toutefois, les résultats du test de flairage par pléthysmographie suggèrent que les souris LOW et HIGH

ont besoin de plus de temps pour échantillonner l'odeur présentée. Ce phénomène est plus marqué chez les souris LOW qui ne se désintéressent pas de l'odeur, ce qui suggère qu'elles n'arrivent pas à prendre une décision aussi rapidement que les souris HIGH et CON.

Dans cette étude, nous avons observé qu'une alimentation déficiente en AGPI n-3 modifie la sensibilité olfactive de la MO et module l'expression de gènes impliqués dans la maturation et la cascade de transduction du signal. En revanche, l'impact du régime enrichi en AGPI n-3 sur la physiologie de la MO est plus modéré. L'analyse moléculaire montre que le régime HIGH diminue le niveau d'expression du RO olfr16 et de la sous-unité Golf mais le niveau d'expression des autres acteurs de la cascade de transduction n'est pas impacté. Le niveau d'expression de SGLT1, un transporteur membranaire du glucose impliqué dans le maintien de l'homéostasie neuronal, est également diminué. Malgré ces modulations, le régime enrichi en AGPI n-3 ne perturbe pas la sensibilité olfactive de la MO. Par ailleurs, nous avons observé que ce régime entraîne une augmentation de l'expression de la cytokine anti-inflammatoire IL-10, ce qui suggère que dans nos conditions expérimentales, le régime HIGH pourrait avoir un rôle protecteur comme cela a été démontré dans d'autres tissus.

En conclusion, les résultats de cette étude montrent qu'une alimentation déséquilibrée en AGPI n-3 modifie le profil des AG dans la MO et module l'expression de gènes impliqués dans la cascade de la transduction du signal olfactif chez les souris adultes. De plus, une diminution de la sensibilité olfactive au niveau périphérique a été mise en évidence chez les souris exposées à un régime déficient en AGPI n-3. Malgré ces modifications, les capacités olfactives des souris ne sont pas affectées. Ces observations suggèrent que le système olfactif possède la faculté de maintenir ses fonctions malgré des perturbations au niveau périphérique.

TITLE

Dietary n-3 polyunsaturated fatty acid deficiency alters olfactory mucosa sensitivity in young mice but has no impact on olfactory behavior

Authors

Vanessa Soubeyre², Laetitia Merle¹, David Jarriault³, Stéphane Grégoire¹, Lionel Bretillon¹, Niyazi Acar¹, Xavier Grosmaître¹ and Anne Marie Le Bon¹

¹Centre des Sciences du Goût et de l'Alimentation, AgroSup Dijon, CNRS, INRAE, Université Bourgogne Franche-Comté, F-21000 Dijon, France.

²Institut de Génomique Fonctionnelle, Université de Montpellier, CNRS UMR-5203, INSERM U1091, F-34094, Montpellier, France.

³NutriNeuro, UMR 1286 INRAE, Bordeaux INP, Université de Bordeaux, F-33076 Bordeaux, France.

ABSTRACT

Background and objective

In mammals, neurons localized in the olfactory mucosa (OM) play a crucial role in the detection of odorants and the transfer of olfactory information toward the brain. We recently showed that perinatal exposure to diets with unbalanced n-6:n-3 polyunsaturated fatty acid (PUFA) ratios affects the OM fatty acid composition. However, the repercussions of these modifications on the physiology of the peripheral olfactory system remain unknown. Here, we investigated the impact of diets unbalanced in n-3 PUFAs on the molecular composition and functionality of the OM in young mice.

Methods

After mating, female mice were fed diets either deficient in α -linolenic acid (LOW diet) or supplemented with n-3 long-chain PUFAs (HIGH diet) during the perinatal period. Weaned male offspring were then fed *ad libitum* with the same experimental diets for 5 weeks. At 8 weeks of age, olfactory behavior tests were performed in the young mice, and their OM was collected. The fatty acid composition of OM and olfactory cilia, as well as the expression of genes involved in different cellular pathways, were analyzed. The electrical potentials in response to odorant stimuli (electroolfactograms) were recorded to assess the impact of diets on OM functionality.

Results and conclusion

Both diets significantly modified the fatty acid profiles of OM and olfactory cilia in young mice. They also induced changes in the expression of genes involved in olfactory signaling and in olfactory neuron maturation. The amplitude in the electroolfactograms was reduced in mice fed the LOW diet. Nevertheless, the LOW diet and the HIGH diet did not affect mouse olfactory behavior. Our study demonstrated that consumption of diets deficient in or supplemented with n-3 PUFAs during the perinatal and postweaning periods caused significant changes in young mouse OM. However, these modifications did not impair their olfactory capacities.

KEYWORDS

olfaction, olfactory mucosa, electroolfactogram, olfactory behavior, fatty acid, maternal diet.

INTRODUCTION

Olfaction is a major sensory modality that provides information about the volatile chemical compounds (odorants) emitted in our environment. This sense plays a vital role in the quest for food and dietary intake, avoidance of environmental hazards, and social communication [1]. There is also growing evidence that odor perception contributes to achieving and maintaining human well-being [2].

Olfactory signals are induced when odorants reach the olfactory mucosa (OM) located in the nasal cavity. The OM contains several cell types, including olfactory sensory neurons (OSNs), that regenerate throughout life [3]. On the apical side of the OM, OSN dendrites end with 5-20 cilia floating in the mucus. Olfactory receptors (ORs) and other signal transduction components (including olfactory G-protein subunit G α olf, adenylate cyclase III (ACIII) and ionic transport channels) are located in these cilia. The interaction of odorants with ORs triggers the transduction cascade that converts chemical stimuli into electrical signals. The generated action potentials are then conveyed along the axons toward the olfactory bulbs where olfactory information is encoded before being carried out to the primary olfactory cortex to be further processed [4,5].

Endogenous and exogenous factors contribute to olfactory plasticity. In particular, evidence has shown that nutritional and metabolic status play a key role in modulating olfactory perception [6]. Recent studies have shown that diets with high lipid levels can disturb rodent olfactory abilities [7–9]. Whether these effects result from quantitative (i.e., an excessive amount of dietary lipids) or from qualitative (i.e., an imbalance in fatty acid (FA) composition) variations remains unknown.

Similar to the brain and retina, the rodent OM and olfactory bulbs contain high levels of polyunsaturated fatty acids (PUFAs) (up to 39% of the total FAs), mainly found in phospholipids (PLs) [10,11]. They are particularly rich in docosahexaenoic acid (DHA; 22:6 n-3) and arachidonic acid (AA; 20:4n-6). DHA and AA are derived from α -linolenic acid (ALA; 18:3n-3) and linoleic acid (LA; 18:2n-6), respectively, that cannot be produced by mammalian tissues and need to be supplied by the diet. PUFAs are crucial for the development and functioning of mammalian neural tissues. They are involved in neurogenesis, neuronal survival, synaptic transmission, membrane biophysical properties and neuroinflammation [12].

The composition of Western diets has changed dramatically over the last decades. In particular, they contain high amounts of n-6 PUFAs and small amounts of n-3 PUFAs, resulting in an n-6:n-3 ratio greater than 20:1, which contrasts sharply with the recommended ratio of 4:1 [13]. The consumption of diets with a high n-6:n-3 ratio leads to reduced DHA and increased AA in many tissues. In neural

tissues such as the brain and retina, these modifications can result in reduced cognitive ability, increased emotional behavior and impaired vision [14,15]. However, it has been largely unexplored whether unbalanced PUFA diets modify the biochemical composition and functionality of olfactory tissues. A few studies performed on rats have shown that consumption of diets deficient in n-3 PUFAs for two generations significantly increased the docosapentaenoic acid (DPA n-6; 22:5n-6) level in the olfactory bulbs and impaired their olfactory discrimination capacities [11,16]. In a recent study, we showed that the PL molecular species profiles of OM in weaning mice were significantly modified when the maternal diets were unbalanced in n-3 PUFAs [17]. The repercussions of these modifications on the properties of the peripheral olfactory system remain to be evaluated.

The present study was therefore designed to explore the effects of perinatal and postweaning diets depleted in ALA or supplemented with n-3 long-chain PUFAs on the molecular composition and functionality of OM in 8-week-old offspring. To achieve this goal, several specific targets were studied: (i) the FA composition of OM and olfactory cilia; ii) the biophysical properties of olfactory cilia; iii) the mRNA expression of genes known to play important roles in neurogenesis, olfactory signal transduction, lipid metabolism and energy balance; iv) the OM electrical potentials in response to olfactory stimuli. In addition, the olfactory capacities (detection threshold and discrimination ability) of mice were assessed.

MATERIALS AND METHODS

Animals and diets

The experimental procedure was conducted in conformity with the guidelines of the European Community for the use and care of laboratory animals (2010/63/EU). It was approved by the French Ministry for Research and Higher Education and the local Ethics Committee (Comité d'Éthique de l'Expérimentation Animale Grand Campus Dijon; reference APAFIS#23807-2020021909594039).

The diet composition and the experimental procedure were detailed in Khoury et al. [17]. Briefly, the experimental diets were manufactured by the Experimental Foods Preparation Unit (INRAE, Jouy-en-Josas, France). They were based on an AIN-93G diet formulation with 5% lipids. Three lipid blends containing various proportions of commercial high-oleic sunflower oil, sunflower oil, palm oil, rapeseed oil and fish oil were incorporated into the different diets. Compared to the control (CON) diet, the LOW diet contained a lower level of ALA, whereas the HIGH diet contained n-3 long-chain PUFAs (eicosapentaenoic acid (20:5n-3), docosapentaenoic acid (22:5n-3) and DHA) (**Table 1**).

After mating, 12-week-old nulliparous female C57BL/6 mice were fed *ad libitum* with one of the three experimental diets until pup weaning. Male offspring were then fed *ad libitum* with the same experimental diet as their dams for 5 weeks. At 8 weeks of age, mice were sacrificed by decapitation after anesthesia by i.p. injection of ketamine and xylazine (150 mg/kg and 10 mg/kg bodyweight, respectively). After dissecting the nose, the OM was collected and immediately snap-frozen in liquid nitrogen. The OM was stored at -80°C until further processing.

Fatty acid extraction and analysis

The total lipids from OM were extracted according to the Folch method [18]. The procedure was detailed in our previous study [17]. After transmethylation using boron trifluoride in methanol, FA methyl esters were extracted with hexane and analyzed by gas chromatography coupled to flame ionization detection as previously described [10]. The results were expressed as percentages of total FAs.

Olfactory cilia preparation

Olfactory cilia isolation was performed using the Na^+ and Ca^{2+} shock method as described by Kuhlmann et al. [19,20]. Briefly, OMs from 6 mice were pooled and washed with an ice-cold solution containing 20 mM HEPES, 140 mM NaCl, 3 mM KCl, 2 mM MgSO_4 , 7.5 mM glucose and 5 mM EGTA (solution A; pH 7.4). They were then resuspended in solution A supplemented with 20 mM CaCl_2 and 30 mM KCl. Cilia were detached by gentle stirring for 20 min at 4°C and isolated by centrifugation for 5 min (6,600 g, 4°C). The supernatant was collected, and the deciliation procedure was repeated five times. The supernatants were pooled and centrifuged at 45,000 g for 30 min at 4°C . The cilia were resuspended in 500 μl of Tris-EDTA buffer and used immediately or stored at -80°C until further analysis.

Measurement of cilia membrane fluidity

Cilia membrane fluidity was assessed by measuring fluorescence anisotropy using 1-(4-(trimethylamine) phenyl)-6-phenylhexa-1.3.5-triene (TMA-DPH) as a probe [21]. Briefly, a pool of freshly prepared cilia (approximately 150 μg protein) was introduced in a 1 cm path length spectroscopic quartz cuvette placed in a stirred and thermostatically controlled (37°C) chamber of a Fluorolog-3 spectrofluorimeter with a T-configuration (HORIBA Jobin-Yvon, Longjumeau, France). Excitation and emission wavelengths were set at 360 nm and 430 nm, respectively. After background noise recording, 1 μL of 1 mM TMA-DPH was added to the cuvette, and the fluorescent anisotropy (r) was measured. The r value is defined as the intensity of the linearly polarized component divided by the total light intensity [19]. Fluorescence anisotropy is inversely proportional to membrane fluidity: the higher the anisotropy (r) is, the more rigid the membrane will be.

RNA extraction and QPCR

Total RNA extraction was conducted according to the manufacturer's instructions (Nucleospin RNA plus kit, Macherey-Nagel). One microgram of total RNA was reverse transcribed with PrimeScript™ reverse transcriptase (PrimeScript™ RT reagent Kit, Takara), and 50 ng of cDNA template was used to carry out QPCR. QPCR was performed using a StepOne thermocycler (Thermo Fisher Scientific, Applied Biosystems) for 40 amplification cycles consisting of 3 s at 95 °C and 30 s at 60 °C. Relative quantification was achieved according to the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method with HPRT and GAPDH as reference genes. The results are presented as the relative quantity (RQ) compared to the CON group.

Electroolfactogram (EOG) recordings

EOG recordings were performed on the OM as previously described [8,22]. Briefly, after sacrifice, the head was cut longitudinally, and the nasal septum was removed to expose the OM endoturbinates. A recording electrode inserted in a glass micropipette filled with a saline solution was positioned in the middle of endoturbinate III. Odorant stimulations were performed by blowing air puffs through an exchangeable Pasteur pipette enclosed in a plastic tube positioned 2 cm from the epithelial surface. A filter paper impregnated with 10 μ L of an odorant solution was placed in the Pasteur pipette. Phenylethyl alcohol (PEA) and acetophenone (ACE) were used as odorants. EOG voltage signals were recorded using an Axoclamp amplifier (Axon Instruments, Molecular Devices, San Jose, USA) and digitized at a rate of 1 kHz using a Digidata 1440 (Axon Instruments). Data were analyzed using MATLAB routines to measure the peak amplitude and kinetics of the response to odorants. Dose–response curves were fitted with the Hill equation model using Prism software (GraphPad, San Diego, USA).

Behavioral experiments

Odor-induced sniffing behavior

A plethysmograph chamber (Emka Technologies, Paris, France) was used to record mouse respiratory activity during odor stimulation as previously described [8]. Briefly, pressure changes induced by mouse breathing were measured by a differential pressure sensor. The respiratory signal collected from the plethysmograph was interfaced to a computer equipped with an AxoScope (Axon Instruments; sampling rate=1 kHz). The day before the test, the mice were habituated to the plethysmograph chamber and to stimulation with distilled water. On the test day, mice were allowed to acclimate to the experimental device before starting the test. After recording breathing activity without odorant stimulation (baseline), increasing concentrations of PEA (10^{-9} M to 10^{-7} M) were applied consecutively for 30 seconds. The recordings were analyzed using MATLAB routines. Inspiration and expiration phases were extracted to calculate respiratory frequency and inspiration amplitude. A z-normalization was applied to integrate these parameters as a z-sniffing index [23].

Olfactory habituation and dishabituation test

We used the protocol of Yang and Crawley to assess the olfactory discrimination capacities of mice [24]. Briefly, the day before the test, mice were placed in individual cages for 30 minutes. On the test day, sequential presentations of mineral oil, PEA and ACE were performed under red light. Odorants were diluted in mineral oil to an approximate gas phase partial pressure of 1 Pa [25]. They were deposited on filter paper placed in a cassette fixed to the lid of the cage. Each odorant was presented during three consecutive trials for two minutes. Each trial was separated by a 1-min interval. The sniffing duration of each visit was recorded.

Statistical analyses

Statistical tests were performed with Prism software (GraphPad, San Diego, USA). FA, anisotropy and gene expression data were analyzed using the nonparametric Mann–Whitney U test. A p value <0.05 was considered statistically significant. EOG recordings and sniffing behavior data were analyzed using two-way repeated-measures ANOVA followed by Bonferroni's multiple comparison test. Data obtained in the habituation and dishabituation tests were analyzed using two-way repeated-measures ANOVA followed by Fischer's LSD post hoc test.

RESULTS

Effects of diet on FA composition of olfactory mucosa and olfactory cilia

Compared to the CON group, the level of total dimethyl acetals (DMAs) in offspring OM was significantly lower (- 6%) in the HIGH group (**Table 2**). The levels of total saturated FAs (SFAs), monounsaturated FAs (MUFAs) and PUFAs were not affected by the LOW and HIGH diets. Nevertheless, both diets significantly modified the proportions of n-6 and n-3 PUFAs in offspring OM. Compared to the CON group, the n-6:n-3 ratio was significantly enhanced (x 3.8) in the LOW group. This effect was due to a substantial increase in n-6 PUFAs (+ 50%) and an important reduction in n-3 PUFAs (- 60%) compared to the CON group (**Table 2**). The OM of the LOW group contained significantly higher levels of AA (+ 35%), 22:4n-6 (+ 94%) and DPA n-6 (x 11) than the OM of the CON group. Conversely, the levels of eicosapentaenoic acid (EPA; 20:5n-3), DPA n-3 and DHA were strongly reduced (-82%, -73% and -57%, respectively). Opposite effects were noticed in OM of the HIGH group. Compared to the CON group, the level of total n-3 PUFAs was increased by approximately +10%, whereas the level of total n-6 PUFAs was decreased by -20%, which led to a significant reduction in the n-6:n-3 ratio (- 30%; **Table 2**). OM from the HIGH offspring had significantly higher EPA and DPA n-3

levels than the CON group (x2.6 and x1.7, respectively). In contrast, the levels of AA, 22:4n-6 and DPA n-6 were greatly reduced (-27%, -44% and -72%, respectively).

Because OSN cilia are essential for odorant detection and signal transduction, we more specifically analyzed the FA composition of this cellular compartment. First, the data revealed that the FA profile of olfactory cilia differed noticeably from that of OM (**Table 2**). Compared to the OM of the CON group, the olfactory cilia of the CON group contained higher levels of SFAs (x1.5) and MUFAs (x1.3) and lower levels of PUFAs (-70%) and DMAs (-49%). The n-6 and n-3 PUFAs accounted for 6.54% and 3.44% of the total FAs in the cilia, respectively.

When comparing the cilia FA composition of the LOW and HIGH groups to that of the CON group, the data showed that the HIGH diet provoked a significant decrease in n-6 PUFAs (-16%) in cilia (**Table 2**). This diet also tended to increase the EPA and DPA n-3 levels (x1.3 and x1.5, respectively) and to reduce DHA levels. Regarding cilia from the LOW group, a nonsignificant increase in the n-6 PUFA level (x1.8) and a nonsignificant decrease in the n-3 PUFA level (-27%) were noted. Compared to the CON group, the unsaturation index was enhanced in the LOW group (+25%).

Influence of diet on membrane fluidity of olfactory cilia

The impacts of diets unbalanced in n-3 PUFAs on the biophysical properties of olfactory cilia membranes were evaluated by fluorescence anisotropy using the TMA-DPH probe. Compared to the CON group, a slight increase in fluorescence anisotropy value (i.e., increase in membrane rigidity) was detected in the LOW group but was not significant (**Figure 1**).

Effects of diet on gene expression in the olfactory mucosa

Compared to the CON diet, the LOW diet significantly reduced the mRNA expression of RTP2 (-34%), a protein involved in the cell surface expression of ORs, and of PDE1C (-11%), an enzyme involved in the termination of olfactory signaling, in offspring OM (**Figures 2A and 2C**). mRNA expression of OMP, a marker of mature OSNs, was also reduced (-24%) in the LOW group, but no modification of mRNA expression of GAP43, a specific marker of immature OSNs, was detected (**Figure 2D**).

The HIGH diet significantly decreased the mRNA expression of the olfactory receptor olfr16 (-25%), the protein G subunit G α olf (-25%) and SGLT1 (-41%), a sodium-dependent glucose transporter, in offspring OM (**Figures 2A, 2B and 2E**). Interestingly, mRNA expression of the anti-inflammatory cytokine IL10 was substantially enhanced in the HIGH group (+74%) (**Figure 2F**).

Notably, the mRNA expression of Tubb3, a marker of neuronal differentiation, was significantly reduced in OM from animals fed the LOW and HIGH diets (-23% and -40%, respectively) (**Figure 2D**).

Both diets had no impact on the mRNA expression of enzymes involved in lipid metabolism (**Figure 2G**).

Effects of diet on olfactory mucosa functionality

EOG recordings showed that, compared to the CON group, the amplitudes of the responses elicited by the highest concentration of PEA and ACE (10^{-1} M) were significantly lower in the LOW group (approximately -60%) (**Figure 3A**). The amplitudes of EOG in the HIGH group did not differ from those recorded in the CON group. In addition, the depolarizing speeds of EOG responses elicited by the high concentrations of PEA and ACE were significantly lower in the LOW group than those in the CON group (-67% and -64%, respectively) (**Figure 3B**). Typical EOG traces obtained after stimulation of OM by PEA or ACE (10^{-1} M) are shown in **Figure 3C**.

Effects of diet on mouse olfactory abilities

The odor detection behavior of the mice was monitored using a plethysmograph. Basal breathing frequency and amplitude were similar in all groups when mice were tested with water alone (**Figure 4A**). When mice were stimulated with an odorant solution containing 10^{-9} M PEA, the Z sniffing indexes increased significantly in the CON, LOW and HIGH groups, indicating that the three groups detected odorants (**Figure 4B**). When a higher concentration of PEA was used (10^{-8} M), mice fed the LOW and HIGH diets exhibited a significant increase in the Z index (**Figure 4C**), while mice fed the CON diet did not respond. The third stimulation with 10^{-7} M PEA elicited a response only in the LOW group (**Figure 4D**).

Olfactory discrimination capacities of mice were assessed using a habituation/dishabituation test (**Figure 5**). Mice from the CON, LOW and HIGH groups showed no deficit in odor discrimination abilities during the different stages of this behavioral test. The significant main effects for the trials ($F_{6,36} = 54.34$, $p < 0.0001$) were detected for time spent sniffing odorants. Post hoc analysis showed that CON, LOW and HIGH mice were able to discriminate the presence of ACE.

DISCUSSION

The present study aimed to investigate the impact of diets deficient in ALA (LOW diet) or supplemented with n-3 long-chain PUFAs (HIGH diet), administered to females from conception until the end of lactation and then to their pups for 5 weeks, on olfactory peripheral system properties and olfactory behavior of the offspring. Our results showed that consumption of the LOW diet induced significant molecular and functional changes in OM. In contrast, molecular modifications elicited by the HIGH diet had no repercussions on OM functionality.

The FA profiles of OM and olfactory cilia were modified by n-3 PUFA unbalanced diets

FA analyses showed that unbalanced n-3 PUFA diets induced significant changes in the PUFA levels of offspring OM. Diets deficient in n-3 PUFAs provoked a substantial increase in n-6 PUFAs (mainly 22:4n-6 and DPA n-6) as well as a strong decrease in n-3 PUFAs (EPA, DPA n-3 and DHA). The diet supplemented with n-3 long-chain PUFAs induced opposite effects, i.e., an increase in n-3 PUFAs (EPA and DPA n-3) and a decrease in n-6 PUFAs (mainly 22:4n-6 and DPA n-6), but to a lesser extent. These observations are in accordance with previous studies showing that PUFA-rich regions of the brain are highly affected by n-3-deficient diets, whereas n-3-supplemented diets have more moderate effects in young adult rodents [26–30]. Our results also showed that the reciprocal replacement of DHA by DPA n-6 in OM was not complete in 8-week-old mice fed an n-3 PUFA-deficient diet. AA and 22:4n-6 also contributed to replacing DHA in OM from LOW young mice. The incomplete replacement of DHA by DPA n-6 in OM during the developmental period might impair the neuronal membrane architecture and homeostasis of OM cells.

In addition, we specifically analyzed the FA pattern of olfactory cilia that emanate from the apical dendrites of OSNs. These structures play an important role in olfactory signaling because they contain ORs and other signal transduction elements. There is growing evidence that signaling components are associated within microdomains along the cilia [31–33] probably in lipid raft domains [34,35]. Rafts are characterized by a high content of cholesterol and complex lipids rich in SFAs and by a reduced content of PUFAs. We observed that mouse olfactory cilia contained high levels of SFAs (60–65% of total FAs) and low amounts of PUFAs (9–14% of total FAs). Our findings are consistent with previous works reporting the presence of complex sphingolipids containing SFAs in ciliary membranes, including mammalian olfactory cilia [36,37].

Although the results should be considered with caution due to the small number of analyzed samples, the FA analyses in olfactory cilia indicated that the LOW diet tended to increase the n-6 PUFA level, causing an enhancement in PUFAs at the expense of SFAs. A decrease in n-3 PUFAs (including DHA) was also detected. Recent studies suggest that PUFAs incorporated into PLs influence raft formation [38–40]. Although not particularly abundant in lipid rafts, DHA would have a significant impact on the structure of these microdomains, due in part to its effects on cholesterol distribution [38,41]. An increase in the FA unsaturation index of olfactory cilia from the LOW group was also observed, suggesting that membrane fluidity could be reduced in these cilia. The slight increase in fluorescence anisotropy observed in LOW cilia reinforces this assumption. Overall, changes in cilia FA composition might impact OSN membrane organization, thereby affecting olfactory cell signaling.

OSN maturation was affected by n-3 PUFA unbalanced diets

It is well known that OM has the capacity to generate new OSNs throughout life. The OM contains two kinds of neurocompetent stem cells: globose basal cells (GBCs) and horizontal basal cells (HBCs). GBCs generally give rise to OSNs and other cell types, whereas HBCs are quiescent stem cells that are activated in cases of severe injury [42]. Both n-3 PUFA unbalanced diets did not modify the expression of progenitor markers (SOX2, neurogenin 1 and neuroD1), indicating that neurogenesis was not disrupted by these diets. Nevertheless, a decrease in the expression of TUBB3, a specific marker of neuronal axon cytoskeleton [43], was observed in the LOW and HIGH OM, thus revealing an impact on OSN maturation. The LOW diet also reduced the expression of OMP, a specific marker of mature OSNs. These findings suggest that n-3 unbalanced diets can affect OSN maturation.

An n-3 PUFA-deficient diet altered peripheral olfactory signaling

EOG recordings revealed that the n-3 PUFA-deficient diet provoked a reduction in the sensitivity of OSNs to odorant stimuli. Both EOG amplitude and kinetics were modulated by this diet, indicating that OSN transduction pathways were probably affected. In fact, a reduction in the expression of genes involved in olfactory signaling, namely, OMP, RTP2 and PDE1C, was observed in OM from the LOW group. Recent studies have demonstrated that OMP is involved in the olfactory transduction cascade [44]. OMP modulates the kinetics of cAMP, the second messenger of olfactory transduction [45]. OSNs lacking OMP exhibit odorant responses with lower amplitude and lower kinetics than OSNs expressing OMP [45–47]. These effects are in line with our observations. RTP2 is a chaperone protein responsible for transporting most ORs to the OSN plasma membrane [48]. A lack of RTP2 in the mouse OM affects OR trafficking and provokes a reduction in the number of mature OSNs and in OSN electrophysiological responses [49]. Reductions in immature OSNs and OM sensitivity in LOW mice might therefore be associated, at least in part, with the reduction in RTP2 expression. How PDE1C reduction affects OM sensitivity is not clear. Indeed, this phosphodiesterase greatly contributes to cAMP degradation in cilia, but other mechanisms may account for the termination of OSN responses. It has been suggested that PDE1C also plays a role in regulating OSN sensitivity and adaptation [50]. These properties might be altered in OM from the LOW group.

An n-3 PUFA-deficient diet disrupted olfactory mucosa sensitivity but not olfactory behavior

The use of a plethysmograph to record mouse breathing showed that animals from the LOW and CON groups increased their sniffing behavior when exposed to the lowest PEA concentration tested, revealing a similar odor sensitivity threshold. However, a difference in PEA sensitivity between these groups was not excluded. Mice from the CON group only reacted to the first PEA stimulation, whereas the LOW mice reacted to all stimulations. We hypothesize that mice from the LOW group need more

odor sampling to analyze the olfactory cues, that is, to determine the odor quality, familiarity, relevance and pleasantness. Alteration of OM sensitivity (revealed by the EOG recordings) in these mice might result in a lower signal input in the olfactory bulbs and piriform cortex, making them unable to fully process the olfactory information during the first odorant stimulation. Nevertheless, despite this weakness, our results indicated that olfactory circuits ensured a sense of smell continuity in mice from the LOW group. This is in agreement with previous studies showing that mice with damaged OM are still able to identify 45% of tested odorants [51]. The habituation/dishabituation behavioral test showed no impact of the LOW diet on olfactory discrimination ability, in contrast to previous studies that reported olfactory discrimination deficits in rats fed n-3 altered diets for two generations [11,16]. This discrepancy might be due to differences in the duration of dietary intervention (two generations versus one generation in this study), the diet composition (higher levels of fat and LA than in our diet) and the species (rat instead of mouse).

Changes induced by diet supplemented with n-3 long-chain PUFAs had no impact on OM functionality and olfactory behavior

The HIGH diet induced a significant decrease in *olfr16* and *Gαolf* mRNA levels in offspring OM, but no other factor involved in the transduction cascade was affected by this diet. These results suggest that the first steps of the canonical olfactory transduction cascade were slightly affected by this diet. Otherwise, the HIGH diet significantly decreased the expression of SGLT1, a membrane glucose transporter. SGLT1 is known to be mainly expressed in key structures of the brain to ensure optimal neuronal functions [52]. The role and precise localization of SGLT1 in the OM remain to be elucidated. Alteration of glucose transport might affect cell homeostasis and hence the functionality of OSNs and/or other OM cells. Nevertheless, consumption of the n-3-supplemented diet did not modify the OM sensitivity or olfactory capacities of mice, suggesting that the observed molecular modifications would have no repercussions on olfactory signal processing in our experimental conditions.

Furthermore, a significant enhancement of the anti-inflammatory marker IL10 in OM from mice fed the HIGH diet was observed. This finding is consistent with the well-documented effects of n-3 PUFAs, specifically EPA and DHA, on inflammation resolution [53,54]. In OM, inflammatory mediators can be produced in response to external factors such as viral and bacterial infections or toxins [55,56]. It would be of great interest to assess whether dietary supplementation with n-3 PUFAs might reduce inflammatory processes in this tissue.

In conclusion, our study showed that consumption of n-3 PUFA unbalanced diets during the perinatal and postweaning periods affected the FA composition of mouse OM and modulated the expression of a number of genes involved in signal transduction and cellular metabolism. In addition, a diet deficient

in n-3 PUFAs was found to impair the electrophysiological properties of OM. However, despite these changes at the peripheral level, mouse olfactory abilities were maintained. These outcomes are in good agreement with earlier studies indicating that rodents can detect odors even though their OM is severely damaged [57,58]. Our study supports the view that olfaction is an extremely resilient chemosensory system.

Acknowledgments

The authors acknowledge the staff of the animal facility of the Centre des Sciences du Goût et de l'Alimentation (Dijon, France) for animal care. The authors also thank Pascale Winckler and Jean-Marie Perrier-Cornet from the Dimacell Platform (Agrosup Dijon, INRAE, Univ. Bourgogne Franche-Comté, F-21000 Dijon, France) for their help in performing the anisotropy analyses.

Disclosure statement

No potential conflict of interest was reported by the authors.

Funding

This work was supported by the Groupe Lipides et Nutrition (GLN), the Conseil Régional Bourgogne Franche-Comté, the European Regional Development Fund (FEDER), the Institut National de Recherche en Agriculture, Alimentation et Environnement (INRAE), and the Fondation de France/Fondation de l'Oeil.

Author contributions

A.M.L.B., V.S., D.J. N.A., L.B. and X.G. conceived and designed the study; V.S. supervised the animal experiment procedures. V.S., L.M., D.J. and S.G. performed analyses; V.S., L.M., D.J. and A.M.L.B. analyzed and interpreted the data; V.S and A.M.L.B. wrote the paper. All authors read and approved the final manuscript.

References

1. Stevenson RJ. An initial evaluation of the functions of human olfaction. *Chem Senses*. 2010;35:3–20.
2. Boesveldt S, Parma V. The importance of the olfactory system in human well-being, through nutrition and social behavior. *Cell Tissue Res*. 2021;383:559–67.
3. Schwob JE, Jang W, Holbrook EH, Lin B, Herrick DB, Peterson JN, et al. Stem and progenitor cells of the mammalian olfactory epithelium: Taking poietic license. *J Comp Neurol*. 2017;525:1034–54.
4. Firestein S. How the olfactory system makes sense of scents. *Nature*. 2001;413:211–8.
5. Kleene SJ. The electrochemical basis of odor transduction in vertebrate olfactory cilia. *Chem Senses*. 2008;33:839–59.
6. Palouzier-Paulignan B, Lacroix M-C, Aimé P, Baly C, Caillol M, Congar P, et al. Olfaction under metabolic influences. *Chem Senses*. 2012;37:769–97.
7. Thiebaud N, Johnson MC, Butler JL, Bell GA, Ferguson KL, Fadool AR, et al. Hyperlipidemic diet causes loss of olfactory sensory neurons, reduces olfactory discrimination, and disrupts odor-reversal learning. *J Neurosci*. 2014;34:6970–84.
8. Merle L, Person O, Bonnet P, Grégoire S, Soubeyre V, Grosmaître X, et al. Maternal high fat high sugar diet disrupts olfactory behavior but not mucosa sensitivity in the offspring. *Psychoneuroendocrinology*. 2019;104:249–58.
9. Lacroix M-C, Caillol M, Durieux D, Monnerie R, Grebert D, Pellerin L, et al. Long-lasting metabolic imbalance related to obesity alters olfactory tissue homeostasis and impairs olfactory-driven behaviors. *Chem Senses*. 2015;40:537–56.
10. Le Bon AM, Deprêtre N, Sibille E, Cabaret S, Grégoire S, Soubeyre V, et al. Comprehensive study of rodent olfactory tissue lipid composition. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 2018;131:32–43.
11. Hichami A, Datiche F, Ullah S, Liénard F, Chardigny J-M, Cattarelli M, et al. Olfactory discrimination ability and brain expression of c-fos, Gir and Glut1 mRNA are altered in n-3 fatty acid-depleted rats. *Behav Brain Res*. 2007;184:1–10.
12. Bazinet RP, Layé S. Polyunsaturated fatty acids and their metabolites in brain function and disease. *Nat Rev Neurosci*. 2014;15:771–85.
13. Anses. Apports en acides gras de la population vivant en France et comparaison aux apports nutritionnels conseillés définis en 2010. 2015. Available from: <https://www.anses.fr/fr/content/les-lipides>.
14. Brenna JT. Animal studies of the functional consequences of suboptimal polyunsaturated fatty acid status during pregnancy, lactation and early post-natal life. *Matern Child Nutr*. 2011;7 Suppl 2:59–79.
15. de Velasco PC, Mendonça HR, Borba JMC, Andrade da Costa BL da S, Guedes RCA, Navarro DM do AF, et al. Nutritional restriction of omega-3 fatty acids alters topographical fine tuning and leads to a delay in the critical period in the rodent visual system. *Exp Neurol*. 2012;234:220–9.

16. Greiner RS, Moriguchi T, Slotnick BM, Hutton A, Salem N. Olfactory discrimination deficits in n-3 fatty acid-deficient rats. *Physiol Behav.* 2001;72:379–85.
17. Khoury S, Soubeyre V, Cabaret S, Merle L, Grégoire S, Deprêtre N, et al. Perinatal exposure to diets with different n-6:n-3 fatty acid ratios affects olfactory tissue fatty acid composition. *Sci Rep.* 2020;10:10785.
18. Folch J, Lees M, Sloane Stanley GH. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J Biol Chem.* 1957;226:497–509.
19. Kuhlmann K, Tschapek A, Wiese H, Eisenacher M, Meyer HE, Hatt HH, et al. The membrane proteome of sensory cilia to the depth of olfactory receptors. *Mol Cell Proteomics.* 2014;13:1828–43.
20. Kurtenbach S, Gießl A, Strömberg S, Kremers J, Atorf J, Rasche S, et al. The BEACH protein LRBA promotes the localization of the heterotrimeric G-protein golf to olfactory cilia. *Sci Rep.* 2017;7:8409.
21. Debbabi M, Zarrouk A, Bezine M, Meddeb W, Nury T, Badreddine A, et al. Comparison of the effects of major fatty acids present in the Mediterranean diet (oleic acid, docosahexaenoic acid) and in hydrogenated oils (elaidic acid) on 7-ketocholesterol-induced oxiaoptophagy in microglial BV-2 cells. *Chem Phys Lipids.* 2017;207:151–70.
22. Lacroix M-C, Badonnel K, Meunier N, Tan F, Poupon CS-L, Durieux D, et al. Expression of insulin system in the olfactory epithelium: first approaches to its role and regulation. *J Neuroendocrinol.* 2008;20:1176–90.
23. Guilloux J-P, Seney M, Edgar N, Sibille E. Integrated behavioral z-scoring increases the sensitivity and reliability of behavioral phenotyping in mice: relevance to emotionality and sex. *J Neurosci Methods.* 2011;197:21–31.
24. Yang M, Crawley JN. Simple behavioral assessment of mouse olfaction. *Curr Protoc Neurosci.* 2009;Chapter 8:Unit 8.24.
25. Mandairon N, Sultan S, Rey N, Kermen F, Moreno M, Busto G, et al. A computer-assisted odorized hole-board for testing olfactory perception in mice. *J Neurosci Methods.* 2009;180:296–303.
26. Pélerin H, Jouin M, Lallemand M-S, Alessandri J-M, Cunnane SC, Langelier B, et al. Gene expression of fatty acid transport and binding proteins in the blood-brain barrier and the cerebral cortex of the rat: differences across development and with different DHA brain status. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 2014;91:213–20.
27. Joffre C, Grégoire S, De Smedt V, Acar N, Bretillon L, Nadjar A, et al. Modulation of brain PUFA content in different experimental models of mice. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 2016;114:1–10.
28. Lacombe RJS, Chouinard-Watkins R, Bazinet RP. Brain docosahexaenoic acid uptake and metabolism. *Mol Aspects Med.* 2018;64:109–34.
29. Schnebelen C, Viau S, Grégoire S, Joffre C, Creuzot-Garcher CP, Bron AM, et al. Nutrition for the eye: different susceptibility of the retina and the lacrimal gland to dietary omega-6 and omega-3 polyunsaturated fatty acid incorporation. *Ophthalmic Res.* 2009;41:216–24.

30. Schnebelen C, Grégoire S, Pasquis B, Joffre C, Creuzot-Garcher CP, Bron AM, et al. Dietary n-3 and n-6 PUFA enhance DHA incorporation in retinal phospholipids without affecting PGE(1) and PGE (2) levels. *Lipids*. 2009;44:465–70.
31. Takeuchi H, Kurahashi T. Second messenger molecules have a limited spread in olfactory cilia. *J Gen Physiol*. 2018;150:1647–59.
32. Meyer SA, Ozbay BN, Potcoava M, Salcedo E, Restrepo D, Gibson EA. Super-resolution imaging of ciliary microdomains in isolated olfactory sensory neurons using a custom two-color stimulated emission depletion microscope. *J Biomed Opt*. 2016;21:66017.
33. Castillo K, Restrepo D, Bacigalupo J. Cellular and molecular Ca²⁺ microdomains in olfactory cilia support low signaling amplification of odor transduction. *Eur J Neurosci*. 2010;32:932–8.
34. Schreiber S, Fleischer J, Breer H, Boekhoff I. A possible role for caveolin as a signaling organizer in olfactory sensory membranes. *J Biol Chem*. 2000;275:24115–23.
35. Brady JD, Rich TC, Le X, Stafford K, Fowler CJ, Lynch L, et al. Functional role of lipid raft microdomains in cyclic nucleotide-gated channel activation. *Mol Pharmacol*. 2004;65:503–11.
36. Lobasso S, Lopalco P, Angelini R, Baronio M, Fanizzi FP, Babudri F, et al. Lipidomic analysis of porcine olfactory epithelial membranes and cilia. *Lipids*. 2010;45:593–602.
37. Kaiser F, Huebecker M, Wachten D. Sphingolipids controlling ciliary and microvillar function. *FEBS Lett*. 2020;594:3652–67.
38. Shaikh SR, Kinnun JJ, Leng X, Williams JA, Wassall SR. How polyunsaturated fatty acids modify molecular organization in membranes: insight from NMR studies of model systems. *Biochim Biophys Acta*. 2015;1848:211–9.
39. Bennett WFD, Shea J-E, Tieleman DP. Phospholipid chain interactions with cholesterol drive domain formation in lipid membranes. *Biophys J*. 2018;114:2595–605.
40. Wang C, Yu Y, Regen SL. Lipid raft formation: key role of polyunsaturated phospholipids. *Angew Chem Int Ed Engl*. 2017;56:1639–42.
41. Wassall SR, Stillwell W. Polyunsaturated fatty acid-cholesterol interactions: domain formation in membranes. *Biochim Biophys Acta*. 2009;1788:24–32.
42. Glezer I, Malnic B. Olfactory receptor function. *Handb Clin Neurol*. 2019;164:67–78.
43. Roskams AJ, Cai X, Ronnett GV. Expression of neuron-specific beta-III tubulin during olfactory neurogenesis in the embryonic and adult rat. *Neuroscience*. 1998;83:191–200.
44. Dibattista M, Al Koborssy D, Genovese F, Reisert J. The functional relevance of olfactory marker protein in the vertebrate olfactory system: a never-ending story. *Cell Tissue Res*. 2021;383:409–27.
45. Reisert J, Yau K-W, Margolis FL. Olfactory marker protein modulates the cAMP kinetics of the odour-induced response in cilia of mouse olfactory receptor neurons. *J Physiol*. 2007;585:731–40.
46. Lee AC, He J, Ma M. Olfactory marker protein is critical for functional maturation of olfactory sensory neurons and development of mother preference. *J Neurosci*. 2011;31:2974–82.

47. Dibattista M, Reisert J. The odorant receptor-dependent role of olfactory marker protein in olfactory receptor neurons. *J Neurosci*. 2016;36:2995–3006.
48. Saito H, Kubota M, Roberts RW, Chi Q, Matsunami H. RTP family members induce functional expression of mammalian odorant receptors. *Cell*. 2004;119:679–91.
49. Sharma R, Ishimaru Y, Davison I, Ikegami K, Chien M-S, You H, et al. Olfactory receptor accessory proteins play crucial roles in receptor function and gene choice. *eLife*. 2017;6:e21895.
50. Cygnar KD, Zhao H. Phosphodiesterase 1C is dispensable for rapid response termination of olfactory sensory neurons. *Nat Neurosci*. 2009;12:454–62.
51. Youngentob SL, Schwob JE. Odorant identification and quality perception following methyl bromide-induced lesions of the olfactory epithelium. *Behav Neurosci*. 2006;120:1346–55.
52. Julliard A-K, Al Koborssy D, Fadool DA, Palouzier-Paulignan B. Nutrient sensing: another chemosensitivity of the olfactory system. *Front Physiol*. 2017;8:468.
53. Joffre C, Dinel A-L, Chataigner M, Pallet V, Layé S. n-3 Polyunsaturated fatty acids and their derivatives reduce neuroinflammation during aging. *Nutrients*. 2020;12:647.
54. Calder PC. n-3 PUFA and inflammation: from membrane to nucleus and from bench to bedside. *Proc Nutr Soc*. 2020;1–13.
55. Islam Z, Harkema JR, Pestka JJ. Satratoxin G from the black mold *Stachybotrys chartarum* evokes olfactory sensory neuron loss and inflammation in the murine nose and brain. *Environ Health Perspect*. 2006;114:1099–107.
56. Imamura F, Hasegawa-Ishii S. Environmental toxicants-induced immune responses in the olfactory mucosa. *Front Immunol*. 2016;7:475.
57. Youngentob SL, Schwob JE, Sheehe PR, Youngentob LM. Odorant threshold following methyl bromide-induced lesions of the olfactory epithelium. *Physiol Behav*. 1997;62:1241–52.
58. Cheung MC, Jang W, Schwob JE, Wachowiak M. Functional recovery of odor representations in regenerated sensory inputs to the olfactory bulb. *Front Neural Circuits*. 2013;7:207.

Table 1. Fatty acid composition of the experimental diets (% of total fatty acids). CON: control diet; LOW: low n-3 diet; HIGH: high n-3 diet. ALA: α -linolenic acid; DHA: docosahexaenoic acid; DPA: docosapentaenoic acid; EPA: eicosapentaenoic acid; LA: linoleic acid; MUFAs: monounsaturated fatty acids; PUFAs: polyunsaturated fatty acids; SFAs: saturated fatty acids.

Fatty acids	Experimental diets		
	CON	LOW	HIGH
12:0	0.15	0.15	0.14
14:0	0.53	0.60	1.32
15:0			0.12
16:0	13.32	16.00	9.44
16:1n-9			0.10
16:1n-7	0.20	0.17	1.19
17:0			0.14
18:0	4.62	4.65	4.31
18:1 t	3.85	3.39	3.22
18:1n-9	54.32	55.81	51.74
18:1n-7	2.09	0.99	2.32
18:2n-6 (LA)	16.49	16.91	17.62
20:0	0.40	0.28	0.45
20:1n-9	0.52	0.17	0.66
18:3n-3 (ALA)	2.84	0.15	3.03
22:0	0.43	0.58	0.50
22:1n-9	0.11		0.13
20:4n-6			0.14
24:0	0.16	0.21	0.15
20:5n-3 (EPA)			1.97
24:1n-9			0.10
22:5n-3 (DPA n-3)			0.19
22:6n-3 (DHA)			1.08
SFAs	19.59	22.44	16.55
MUFAs	61.08	60.52	59.43
PUFAs	19.33	17.05	24.03
Total n-6 PUFAs	16.49	16.91	17.76
Total n-3 PUFAs	2.84	0.15	6.27
n-6:n-3 PUFA ratio	5.80	116.73	2.83

Table 2. Fatty acid composition of the olfactory mucosa and olfactory cilia (% of total fatty acids). Cilia from 6 mice were pooled into one sample. Data are expressed as the mean \pm s.e.m. (for the OM, n= 5 mice/group; for the cilia, n= 3 samples in the CON and LOW groups and n = 2 samples in the HIGH group). * Values are significantly different from the CON group (Mann–Whitney U test, p < 0.05). # Sum of the percent unsaturated fatty acids multiplied by their number of double bonds. SFAs: saturated fatty acids; MUFAs: monounsaturated fatty acids; PUFAs: polyunsaturated fatty acids; DMAs: dimethyl acetals. n.d.: not detected.

Fatty acids	Olfactory mucosa		
	CON	LOW	HIGH
14:0	0.18 \pm 0.01	0.17 \pm 0.04	0.23 \pm 0.02
15:0	0.07 \pm 0.01	0.06* \pm 0.01	0.06* \pm 0.01
dma16:0	3.86 \pm 0.05	3.55* \pm 0.13	3.75 \pm 0.05
16:0	23.36 \pm 0.57	21.65 \pm 0.57	24.44 \pm 0.75
16:1n-9	0.35 \pm 0.01	0.36 \pm 0.04	0.34 \pm 0.01
16:1n-7	0.84 \pm 0.05	1.08 \pm 0.28	1.05 \pm 0.08
17:0	0.11 \pm 0.01	0.11 \pm 0.01	0.11 \pm 0.01
dma18:0	0.91 \pm 0.02	0.96 \pm 0.04	0.84* \pm 0.02
dma18:1n-9	0.51 \pm 0.01	0.52 \pm 0.04	0.46* \pm 0.01
dma18:1n-7	0.30 \pm 0.01	0.32 \pm 0.01	0.24 \pm 0.01
18:0	20.25 \pm 0.59	20.98 \pm 1.08	21.42 \pm 0.32
18:1t	0.04 \pm 0.01	0.05 \pm 0.01	0.03 \pm 0.01
18:1n-9	12.47 \pm 0.30	13.01 \pm 0.78	12.42 \pm 0.16
18:1n-7	2.63 \pm 0.05	2.84* \pm 0.05	2.39 \pm 0.02
18:2n-6	2.48 \pm 0.11	2.21 \pm 0.15	3.01 \pm 0.09
20:0	0.21 \pm 0.01	0.22 \pm 0.02	0.21 \pm 0.01
18:3n-6 (LA)	0.07 \pm 0.01	0.07 \pm 0.01	0.07 \pm 0.01
20:1n-9	0.28 \pm 0.06	0.32 \pm 0.03	0.19* \pm 0.01
18:3n-3 (ALA)	0.05 \pm 0.01	0.07 \pm 0.01	0.05 \pm 0.02
20:2n-6	0.11 \pm 0.01	0.15 \pm 0.04	0.14 \pm 0.04
20:3n-9	0.51 \pm 0.02	0.55 \pm 0.06	0.47 \pm 0.03
22:0	0.22 \pm 0.01	0.24 \pm 0.03	0.22 \pm 0.02
20:3n-6	1.12 \pm 0.04	1.05 \pm 0.02	1.07 \pm 0.03
22:1n-9	0.20 \pm 0.04	0.23 \pm 0.05	0.16 \pm 0.01
20:4n-6 (AA)	12.20 \pm 0.33	16.51* \pm 0.15	8.93* \pm 0.22
20:5n-3 (EPA)	0.77 \pm 0.02	0.14* \pm 0.01	1.98* \pm 0.06
24:0	0.29 \pm 0.01	0.30 \pm 0.05	0.34 \pm 0.03
24:1n-9	0.23 \pm 0.01	0.26 \pm 0.04	0.23 \pm 0.01
22:4n-6	0.84 \pm 0.03	1.63* \pm 0.04	0.47* \pm 0.02
22:5n-6 (DPA n-6)	0.39 \pm 0.01	4.40* \pm 0.15	0.11* \pm 0.01
22:5n-3 (DPA n-3)	0.44 \pm 0.02	0.12* \pm 0.01	0.77* \pm 0.03
22:6n-3 (DHA)	13.71 \pm 0.23	5.86* \pm 0.54	14.20 \pm 0.47
SFAs	44.70 \pm 1.08	43.73 \pm 0.89	46.65 \pm 0.82
MUFAs	17.05 \pm 0.38	15.15 \pm 1.07	16.82 \pm 0.22
PUFAs	32.68 \pm 0.73	32.75 \pm 0.40	31.25 \pm 0.75
DMAs	5.59 \pm 0.07	5.35 \pm 0.16	5.28* \pm 0.06
Total n-6 PUFAs	17.21 \pm 0.49	26.01* \pm 0.12	13.80* \pm 0.26
Total n-3 PUFAs	14.96 \pm 0.27	6.19* \pm 0.54	16.99* \pm 0.54
n-6:n-3 ratio	1.14 \pm 0.02	4.34* \pm 0.42	0.81* \pm 0.04
AA :DHA ratio	1.12 \pm 0.31	2.81* \pm 0.27	0.63* \pm 0.02
Unsaturation index [#]	170.71 \pm 3.51	159.96 \pm 2.16	165.80 \pm 4.07

Table 2 (suite)

Fatty acids	Olfactory cilia		
	CON	LOW	HIGH
14:0	0.26 ± 0.02	0.26 ± 0.01	0.30 ± 0.02
15:0	0.32 ± 0.05	0.24 ± 0.07	0.29 ± 0.05
dma16:0	1.76 ± 0.35	2.62 ± 0.04	1.49 ± 0.09
16:0	32.71 ± 0.05	29.45 ± 0.87	31.63 ± 1.06
16:1n-9	0.41 ± 0.05	0.68 ± 0.15	0.55 ± 0.01
16:1n-7	0.68 ± 0.02	0.66 ± 0.04	0.99 ± 0.01
17:0	0.22 ± 0.08	0.45 ± 0.05	0.28 ± 0.02
dma18:0	0.53 ± 0.35	0.70 ± 0.01	0.43 ± 0.02
dma18:1n-9	0.28 ± 0.07	0.49 ± 0.01	0.38 ± 0.02
dma18:1n-7	0.32 ± 0.03	0.37 ± 0.01	0.31 ± 0.01
18:0	30.23 ± 1.24	29.42 ± 0.15	31.74 ± 1.13
18:1t	0.19 ± 0.30	0.14 ± 0.01	0.16 ± 0.02
18:1n-9	16.16 ± 0.18	15.02 ± 0.16	17.21 ± 0.26
18:1n-7	3.51 ± 0.81	3.28 ± 0.11	3.26 ± 0.11
18:2n-6	1.86 ± 1.08	1.82 ± 0.03	2.25 ± 0.13
20:0	0.33 ± 0.05	0.28 ± 0.01	0.31 ± 0.04
18:3n-6 (LA)	0.42 ± 0.04	0.40 ± 0.02	0.42 ± 0.06
20:1n-9	0.17 ± 0.03	0.12 ± 0.01	0.15 ± 0.02
18:3n-3 (ALA)	n.d.	n.d.	n.d.
20:2n-6	0.17 ± 0.01	0.12 ± 0.02	0.16 ± 0.04
20:3n-9	0.19 ± 0.04	0.31 ± 0.04	0.22 ± 0.04
22:0	0.37 ± 0.51	0.33 ± 0.03	0.39 ± 0.03
20:3n-6	0.46 ± 0.09	0.74 ± 0.06	0.54 ± 0.08
22:1n-9	0.33 ± 0.11	0.33 ± 0.01	0.28 ± 0.04
20:4n-6 (AA)	3.14 ± 0.83	5.72 ± 0.40	1.92 ± 0.16
20:5n-3 (EPA)	0.38 ± 0.05	0.21 ± 0.00	0.5 ± 0.04
24:0	0.31 ± 0.32	0.33 ± 0.03	0.38 ± 0.01
24:1n-9	0.73 ± 0.15	0.50 ± 0.04	0.56 ± 0.09
22:4n-6	0.34 ± 0.08	0.85 ± 0.04	0.15 ± 0.01
22:5n-6 (DPA n-6)	0.15 ± 0.03	1.81 ± 0.07	0.07 ± 0.01
22:5n-3 (DPA n-3)	0.16 ± 0.01	0.09 ± 0.02	0.24 ± 0.02
22:6n-3 (DHA)	2.90 ± 0.69	2.22 ± 0.08	2.46 ± 0.07
SFAs	64.76 ± 1.94	60.77 ± 0.76	65.31 ± 0.04
MUFAs	22.19 ± 0.48	20.75 ± 0.20	23.16 ± 0.32
PUFAs	10.17 ± 1.81	14.29 ± 0.68	8.91 ± 0.27
DMAs	2.86 ± 0.53	4.18 ± 0.05	2.62 ± 0.10
Total n-6 PUFAs	6.54 ± 1.11	11.46 ± 0.58	5.50* ± 0.34
Total n-3 PUFAs	3.44 ± 0.67	2.51 ± 0.08	3.2 ± 0.10
n-6:n-3 ratio	1.92 ± 0.06	4.55 ± 0.16	1.72 ± 0.02
AA :DHA ratio	1.08 ± 0.04	2.57 ± 0.12	0.78 ± 0.10
Unsaturation index [#]	64.86 ± 8.09	80.01 ± 2.90	59.25 ± 0.18

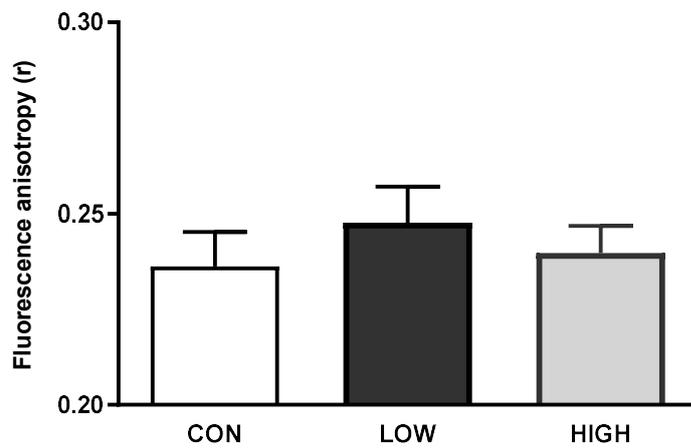


Figure 1. Assessment of cilia membrane fluidity by fluorescence anisotropy (r) using TMA-DPH as a probe. Cilia from 6 mice were pooled into one sample. Data are expressed as the mean \pm s.e.m. (CON, $n=4$ samples; LOW, $n=2$ samples; HIGH, $n=3$ samples). No significant difference was observed between the CON group and the LOW or HIGH groups (Mann–Whitney U test, $p < 0.05$).

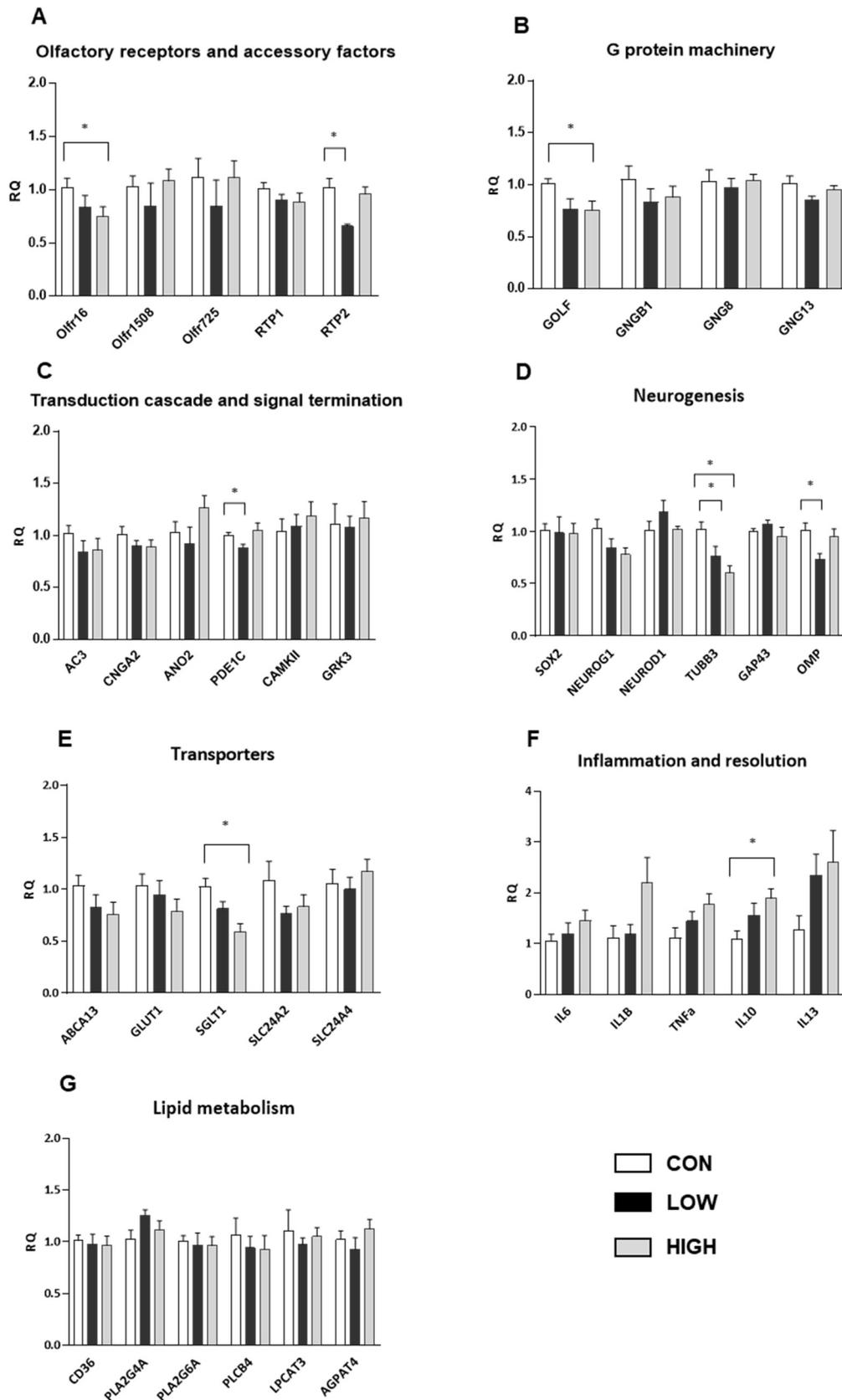


Figure 2. Gene expression in offspring olfactory mucosa. mRNA levels of genes involved in olfactory signaling pathways (A, B and C), neurogenesis (D), cellular transport (E), inflammation and resolution (F) and lipid metabolism (G) were assessed. The results are expressed as the relative quantity (RQ) compared to the CON group. Data are presented as the mean \pm s.e.m. (CON, n=8 mice; LOW, n=8 mice and HIGH, n=7 mice). * Values are significantly different from the CON group (Mann–Whitney U test, $p < 0.05$).

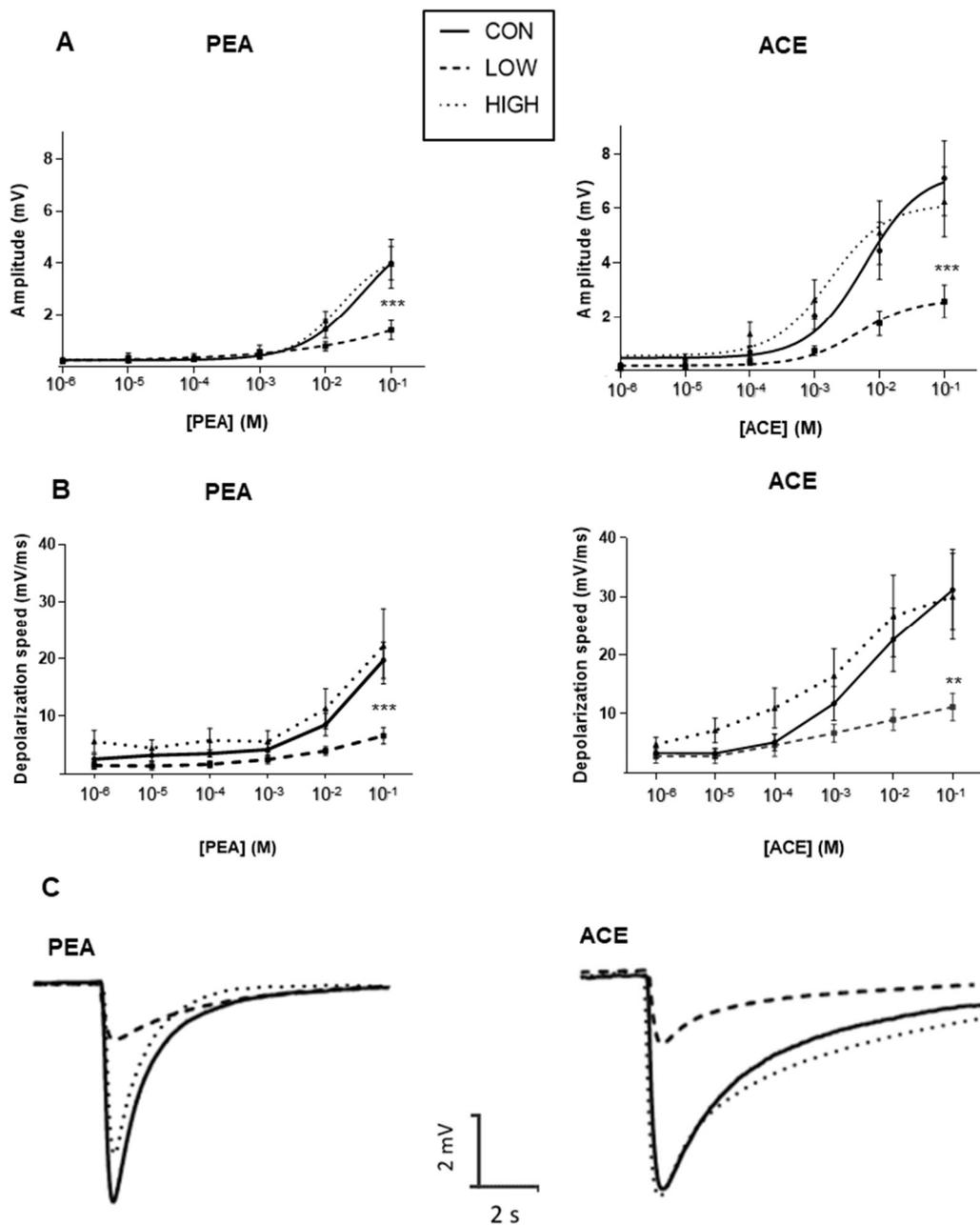


Figure 3. Analysis of electrophysiological responses of olfactory mucosa to odorants using EOG recordings on endoturbinates III. (A) Amplitude of EOG responses after stimulation by increasing concentrations of phenylethyl alcohol (PEA) and acetophenone (ACE); (B) Depolarization speed of EOG responses after stimulation by increasing concentrations of PEA and ACE; (C) Representative EOG traces recorded on OM of the CON, LOW and HIGH groups after stimulations by PEA or ACE (10^{-1} M). Data are expressed as the mean \pm s.e.m. (CON, n = 13 mice; LOW, n = 6 mice; HIGH, n = 9 mice). ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.005$ after a two-way repeated-measures ANOVA followed by Bonferroni post hoc test.

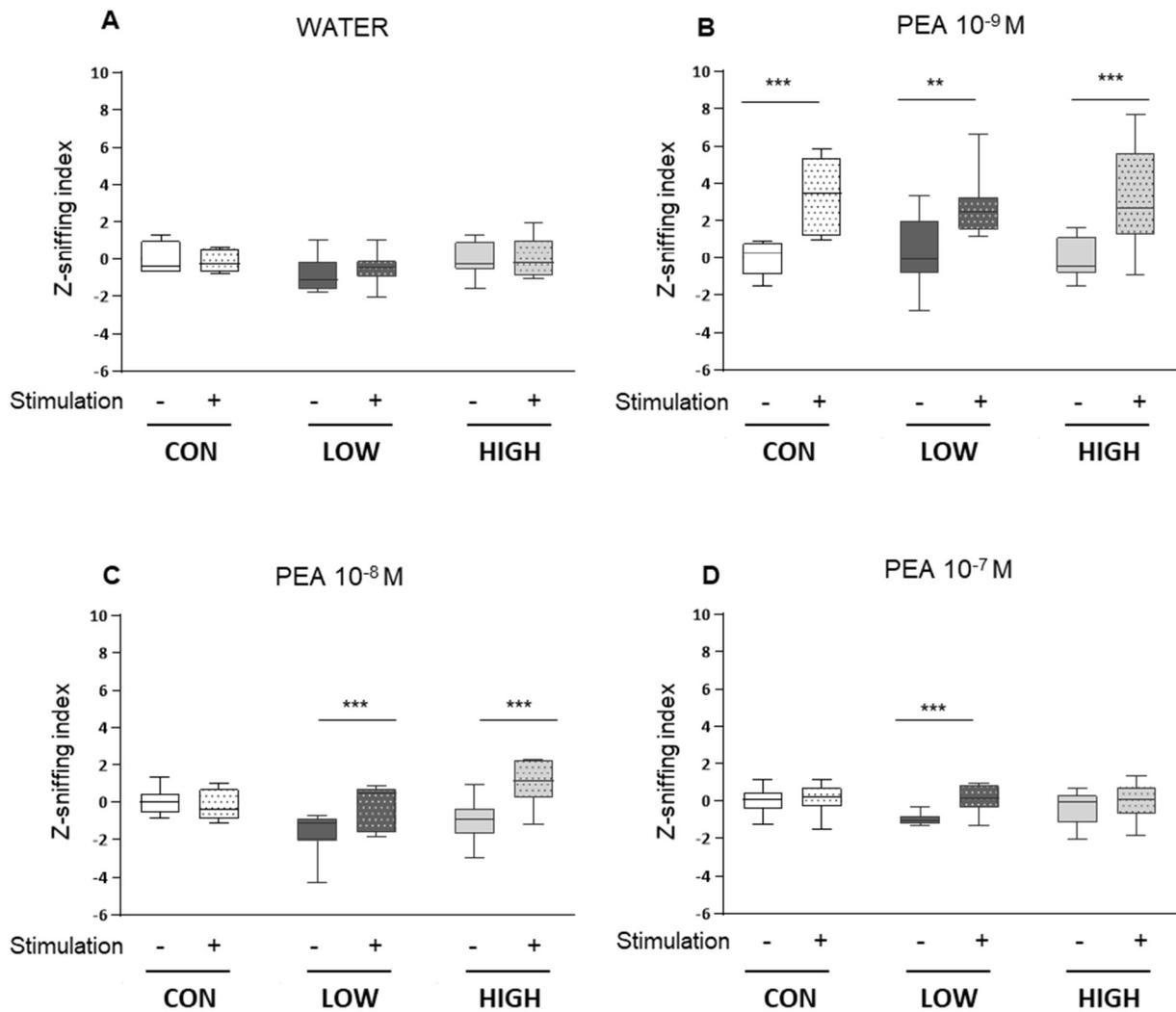


Figure 4. Odor induced sniffing behavior in response to phenylethyl alcohol (PEA) stimulation. Water (A) followed by increasing concentrations of PEA (10^{-9} M (B), 10^{-8} M (C) and 10^{-7} M (D)) were applied consecutively for 30 seconds. The respiratory frequency and inspiration amplitude were measured and integrated as a z-sniffing index. Boxes represent data included between quartile 1 and quartile 3, separated by the median; whiskers show minimum and maximum values (CON, n = 6 mice, LOW, n = 8 mice, HIGH, n = 9 mice). ** p<0.01 and ***p<0.001 after a two-way repeated-measures ANOVA followed by Bonferroni post hoc test.

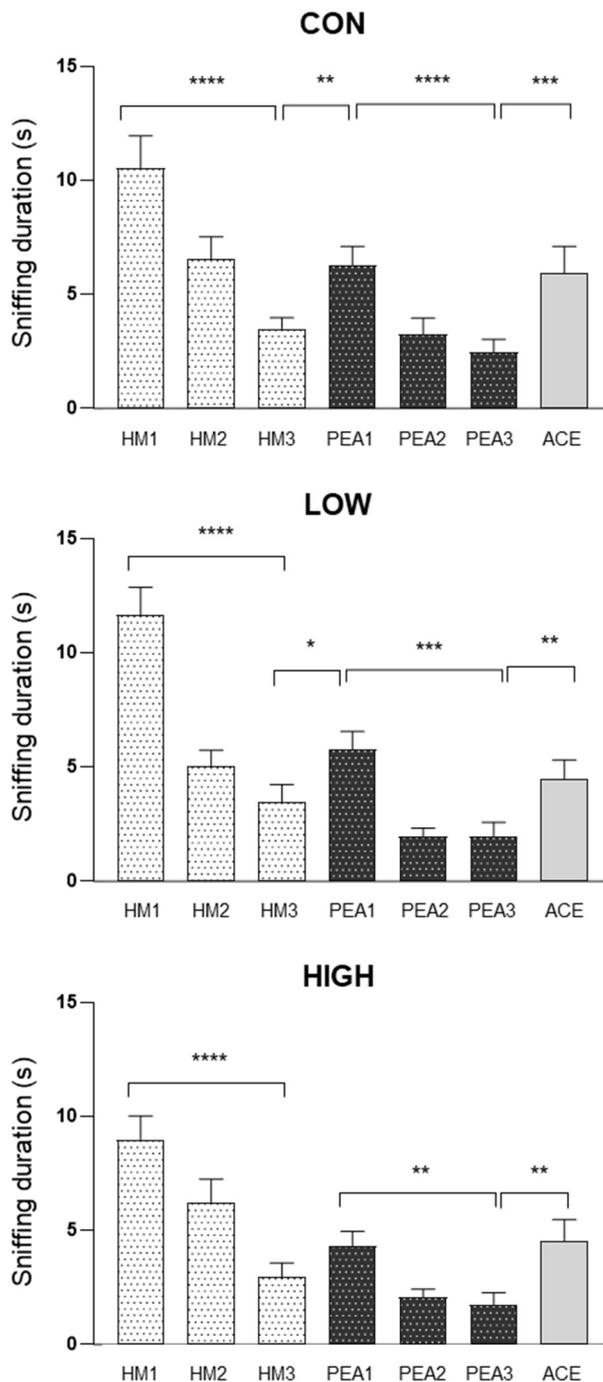


Figure 5. Assessment of olfactory discrimination capacities of mice using a habituation/dishabituation test. Animals were sequentially exposed three times to mineral oil (HM, acclimatization), three times to phenylethyl alcohol (PEA, habituation) and finally to acetophenone (ACE, dishabituation). The duration of sniffing in response to each odorant presentation was measured. Data are presented as the mean \pm s.e.m. (CON, n = 24 mice; LOW, n = 21 mice; HIGH, n = 24 mice). * $p < 0.05$, ** $p < 0.005$; *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$ after a two-way repeated-measures ANOVA followed by Fisher's LSD post hoc test.

b. Impact du développement sur la composition en AG de la MO de souris

Au cours de nos travaux, des analyses d'AG ont été effectuées dans la MO de souris âgées de 3 et 8 semaines. Nous avons souhaité évaluer l'effet du développement sur composition en AG de MO issues de souris mâles exposées aux régimes CON, LOW et HIGH.

- Résultats

Notre étude montre qu'à l'âge de 8 semaines, âge auquel la progéniture atteint l'âge adulte, les régimes LOW et HIGH entraînent des modifications similaires à celles observées à l'âge de 3 semaines. Brièvement, comparé au groupe CON, le régime LOW provoque une importante augmentation de la teneur en AGPI n-6 (+50%) et une forte diminution de la teneur en AGPI n-3 (-60%) dans la MO des souris âgées de 8 semaines. Le régime HIGH induit des effets opposés : il augmente légèrement la teneur en AGPI n-3 (+10%) et diminue modérément la teneur en AGPI n-6 (-20%). Comme dans la MO à 3 semaines, les principaux AGPI modulés par les régimes LOW et HIGH sont l'AA et le DHA (Soubeyre et al, soumis).

La comparaison des résultats obtenus à l'âge de 3 et de 8 semaines indique que le profil des AG de la MO des souris CON évolue légèrement au cours du développement (**Tableau 9**). En effet, nous observons une augmentation supérieure à 20% de la teneur en acide stéarique (18:0) dans la MO des souris CON âgées de 8 semaines. De plus, la teneur en AGPI n-6 totaux est réduite (-16%) tandis que celle en AGPI n-3 totaux est augmentée (+19%). Ces différences sont principalement dues à une diminution de la teneur en 18:2n-6 (-32%) et du 20:4n-6 (-8%) en ce qui concerne les AGPI n-6, et à une augmentation de la teneur en 22:6n-3 (20%).

De manière intéressante, les régimes LOW et HIGH modifient également les teneurs en AG de la MO entre l'âge de 3 et 8 semaines. Comme dans le groupe CON, on observe une augmentation de la teneur en acide stéarique (18:0) dans la MO des groupes LOW et HIGH (respectivement +29% et +25%). Ces changements s'accompagnent d'une diminution de la teneur totale en AGPI n-6 dans les groupes LOW et HIGH (respectivement -13% et -25%), principalement due à une diminution de la teneur en AA (respectivement -6% et -17%). La teneur en DH

A est, quant à elle, respectivement augmentée de 29% et 9% dans la MO des souris âgées de 8 semaines par rapport aux souris âgées de 3 semaines.

Nos résultats montrent également que le DHA s'accumule dans la MO des souris au cours du développement et ce, quel que soit le régime. Dans le groupe LOW, les souris bénéficient d'un apport alimentaire très appauvri en ALA, le précurseur essentiel à la synthèse du DHA. Même si la teneur en DHA dans les MO du groupe LOW âgé de 8 semaines (environ 6%) est nettement inférieure à celle des MO du groupe CON du même âge (environ 14%), le taux de DHA de cette hausse en DHA s'accompagne par une diminution de 7% de la teneur de l'équivalent métabolique du DHA, le DPA n-6, dans la MO des souris âgées de 8 semaines comparé à la MO des souris âgées de 3 semaines.

Tableau 9 : Profil des acides gras de la muqueuse olfactive de souris mâles âgées de 3 et 8 semaines (n= 5 ou 6 souris/groupe). Les données représentent les moyennes \pm e.s.m. Le test non paramétrique de Mann Whitney a été utilisé pour analyser les données. Les groupes âgés de 3 semaines ont été comparés aux groupes âgés de 8 semaines ayant reçu le même régime. * p < 0,05.

Fatty acids	3 weeks old male offspring ¹ olfactory mucosa			8 weeks old offspring ¹ olfactory mucosa		
	CON	LOW	HIGH	CON	LOW	HIGH
14:00	0,63 \pm 0,07	0,82 \pm 0,11	0,93 \pm 0,11	0,18 \pm 0,01	0,17 \pm 0,04	0,23 \pm 0,02
15:00	0,11 \pm 0,00	0,09 \pm 0,00	0,10 \pm 0,00	0,07 \pm 0,00	0,06 \pm 0,01	0,06 \pm 0,01
dma16:0	3,87 \pm 0,04	3,80 \pm 0,10	3,76 \pm 0,07	3,86 \pm 0,05	3,55 \pm 0,13	3,75 \pm 0,05
16:00	24,70 \pm 0,23	23,36 \pm 0,39	23,62 \pm 0,40	23,37 \pm 0,57	21,65 \pm 0,59	24,44 \pm 0,75
16:1n-9	0,56 \pm 0,01	0,54 \pm 0,01	0,44 \pm 0,01	0,35 \pm 0,01	0,36 \pm 0,04	0,34 \pm 0,01
16:1n-7	0,95 \pm 0,06	0,93 \pm 0,16	1,20 \pm 0,15	0,84 \pm 0,05	1,08 \pm 0,29	1,05 \pm 0,08
17:00	0,14 \pm 0,00	0,13 \pm 0,00	0,14 \pm 0,00	0,11 \pm 0,00	0,11 \pm 0,00	0,11 \pm 0,00
dma18:0	0,91 \pm 0,03	0,95 \pm 0,02	0,96 \pm 0,02	0,91 \pm 0,02	0,96 \pm 0,04	0,83 \pm 0,02
dma18:1n-9	0,57 \pm 0,02	0,60 \pm 0,02	0,56 \pm 0,02	0,51 \pm 0,01	0,52 \pm 0,04	0,46 \pm 0,01
dma18:1n-7	0,24 \pm 0,02	0,27 \pm 0,02	0,25 \pm 0,02	0,30 \pm 0,01	0,32 \pm 0,01	0,24 \pm 0,01
18:00	16,44 \pm 0,25	16,25 \pm 0,23	16,09 \pm 0,36	20,25* \pm 0,59	20,98* \pm 1,08	21,04* \pm 0,32
18:1t	0,07 \pm 0,00	0,06 \pm 0,00	0,05 \pm 0,00	0,04 \pm 0,00	0,05 \pm 0,00	0,03 \pm 0,00
18:1n-9	13,29 \pm 0,21	13,01 \pm 0,33	13,57 \pm 0,24	12,47* \pm 0,30	13,01 \pm 0,78	12,42* \pm 0,16
18:1n-7	2,79 \pm 0,06	2,81 \pm 0,04	2,64 \pm 0,04	2,63 \pm 0,05	2,84 \pm 0,05	2,39 \pm 0,03
18:2n-6	3,67 \pm 0,19	3,40 \pm 0,19	4,80 \pm 0,08	2,49* \pm 0,11	2,21* \pm 0,15	3,01* \pm 0,09
20:00	0,16 \pm 0,01	0,16 \pm 0,01	0,17 \pm 0,01	0,21 \pm 0,00	0,22 \pm 0,02	0,21 \pm 0,01
18:3n-6	0,10 \pm 0,00	0,09 \pm 0,00	0,10 \pm 0,00	0,07 \pm 0,00	0,07 \pm 0,00	0,07 \pm 0,00
20:1n-9	0,47 \pm 0,11	0,41 \pm 0,05	0,60 \pm 0,09	0,28 \pm 0,06	0,32 \pm 0,04	0,19 \pm 0,01
18:3n-3	0,04 \pm 0,01	0,02 \pm 0,00	0,06 \pm 0,01	0,05 \pm 0,01	0,07 \pm 0,01	0,05 \pm 0,02
20:1n-7	0,07 \pm 0,01	0,06 \pm 0,01	0,07 \pm 0,01	n.d \pm 0,00	n.d \pm 0,00	n.d \pm 0,00
20:2n-6	0,29 \pm 0,02	0,36 \pm 0,02	0,33 \pm 0,01	0,11 \pm 0,00	0,15 \pm 0,04	0,14 \pm 0,04
20:3n-9	0,38 \pm 0,02	0,39 \pm 0,02	0,24 \pm 0,01	0,51 \pm 0,02	0,55 \pm 0,06	0,46 \pm 0,03
22:00	0,13 \pm 0,02	0,17 \pm 0,03	0,19 \pm 0,03	0,22 \pm 0,01	0,24 \pm 0,03	0,22 \pm 0,02
20:3n-6	1,33 \pm 0,03	1,34 \pm 0,06	1,53 \pm 0,03	1,12 \pm 0,04	1,05 \pm 0,02	1,07 \pm 0,03
22:1n-9	0,14 \pm 0,01	0,13 \pm 0,01	0,13 \pm 0,01	0,20 \pm 0,04	0,23 \pm 0,05	0,16 \pm 0,01
20:4n-6	13,22 \pm 0,17	17,53 \pm 0,43	10,74 \pm 0,21	12,20* \pm 0,34	16,51 \pm 0,15	8,93* \pm 0,22
20:5n-3	0,55 \pm 0,02	0,15 \pm 0,00	1,35 \pm 0,05	0,77 \pm 0,02	0,14 \pm 0,01	1,98 \pm 0,07
24:00	0,20 \pm 0,01	0,19 \pm 0,01	0,22 \pm 0,02	0,29 \pm 0,01	0,30 \pm 0,05	0,34 \pm 0,03
24:1n-9	0,25 \pm 0,02	0,27 \pm 0,02	0,27 \pm 0,03	0,23 \pm 0,01	0,26 \pm 0,04	0,23 \pm 0,01
22:4n-6	1,29 \pm 0,03	2,35 \pm 0,13	0,82 \pm 0,03	0,84 \pm 0,03	1,63 \pm 0,04	0,47 \pm 0,02
22:5n-6	0,52 \pm 0,03	4,73 \pm 0,26	0,14 \pm 0,00	0,39 \pm 0,01	4,39 \pm 0,15	0,11 \pm 0,01
22:5n-3	0,57 \pm 0,02	0,16 \pm 0,01	1,00 \pm 0,04	0,44 \pm 0,02	0,12 \pm 0,01	0,77 \pm 0,03
22:6n-3	11,38 \pm 0,19	4,51 \pm 0,35	12,94 \pm 0,41	13,71* \pm 0,23	5,86* \pm 0,54	14,19* \pm 0,48
SFAs	42,52 \pm 0,41	41,12 \pm 0,52	41,45 \pm 0,53	44,70* \pm 1,08	43,73* \pm 0,89	46,65* \pm 0,82
MUFAs	18,57 \pm 0,33	18,21 \pm 0,58	18,96 \pm 0,47	17,05* \pm 0,38	18,15 \pm 1,07	16,82* \pm 0,22
PUFAs	33,33 \pm 0,49	35,01 \pm 0,58	34,05 \pm 0,71	32,69* \pm 0,75	32,76* \pm 0,40	31,25* \pm 0,75
DMAs	5,59 \pm 0,09	5,62 \pm 0,09	5,53 \pm 0,08	5,59 \pm 0,08	5,35 \pm 0,16	5,28 \pm 0,06
Total n-6 PUFAs	20,41 \pm 0,33	29,79 \pm 0,84	18,45 \pm 0,25	17,21* \pm 0,49	26,00* \pm 0,12	13,80* \pm 0,26
Total n-3 PUFAs	12,54 \pm 0,21	4,83 \pm 0,34	15,36 \pm 0,47	14,97* \pm 0,27	6,20* \pm 0,54	16,99* \pm 0,54
n-6/n-3 ratio	1,63 \pm 0,02	6,38 \pm 0,61	1,20 \pm 0,02	1,15* \pm 0,02	4,34* \pm 0,42	0,81* \pm 0,02

SFAs : Saturated fatty acids, MUFAs : monosaturated fatty acids, PUFAs : polyunsaturated fatty acids,

DMAs : dimethyl acetals, n.d : not detected

- Interprétation

Après le tissu adipeux, le cerveau est le tissu le plus riche en lipides. Chez les rongeurs, l'AA et le DHA sont les deux principaux AGPI-LC présents dans le cerveau ; ils représentent respectivement 10% et 12% des AG totaux. Dans la MO de souris, les proportions d'AA et de DHA sont similaires à celles observées dans le cerveau. En effet, dans la MO du groupe CON, les teneurs en AA et DHA sont respectivement de 13% et de 11% à l'âge de 3 semaines et respectivement de 12% et 14% à l'âge de 8 semaines. De plus, on observe une augmentation de 17% de la teneur en DHA dans la MO des souris du groupe CON entre l'âge de 3 et 8 semaines, sans que la teneur en AA ne soit trop réduite.

L'AA et le DHA ont un rôle structural lorsqu'ils sont incorporés dans les phospholipides membranaires des cellules. Dans le cerveau, leurs teneurs augmentent de manière significative au cours du développement pour répondre aux besoins de croissance du cerveau (Lacombe, 2018). Ainsi, il a été démontré que l'accumulation des AGPI dans le cerveau des rongeurs a principalement lieu lors des 3 premières semaines de vie. Cette période de développement intense correspond aussi à la phase d'allaitement durant laquelle l'apport en AGPI repose principalement sur l'alimentation maternelle, le déstockage des AGPI à partir du tissu adipeux des mères et/ou la synthèse des AGPI dans les glandes mammaires (Lacombe *et al.*, 2018; Martinat *et al.*, 2021).

La MO est un tissu où la neurogénèse a lieu tout au long de la vie. C'est un tissu qui a la particularité de contenir en permanence de neurones matures et immatures qui vont former de nouvelles synapses dans les BO. Les changements des profils d'AG observés entre l'âge de 3 et 8 semaines pourraient aussi être le reflet de la genèse et de la maturation de nouveaux neurones et de fibres nerveuses qui requièrent l'incorporation d'AGPI (dont le DHA) dans les membranes au cours de ces processus.

PARTIE 4

Discussion Générale

Les progrès dans le secteur de l'industrie et de l'agroalimentaire après la révolution industrielle ont eu pour conséquence de modifier en profondeur l'alimentation de base des habitants des pays industrialisés. Parmi les nutriments indispensables au bon fonctionnement de l'organisme, les lipides sont utilisés comme source d'énergie et comme source d'acides gras essentiels au maintien de l'homéostasie cellulaire. Aujourd'hui, l'ANSES recommande de consommer entre 35-40% de lipides pour couvrir les besoins physiologiques d'un individu en respectant un apport nutritionnel de 4 AGPI n-6 pour 1 AGPI n-3 afin de limiter les effets délétères de certains AGPI sur la santé.

Peu d'études se sont intéressées au rôle des AGPI dans la physiologie du système olfactif périphérique. Pourtant, la MO contient une teneur élevée en AGPI (34-39% des AG totaux chez les rongeurs, 29% chez l'Homme) (Le Bon *et al.*, 2018; Khoury *et al.*, 2020). Dans la MO de souris adultes, les AGPI des séries n-6 et n-3 représentent respectivement 20% et 14% des AG totaux. Etant donné l'importance des AGPI de la série n-3 dans les tissus neuronaux, nous nous sommes questionnés sur l'impact que pourraient avoir des régimes déséquilibrés en AGPI n-3 sur la physiologie de la MO. En effet, la MO contient plusieurs types cellulaires, dont des neurones olfactifs qui jouent un rôle fondamental dans la détection des odorants et la transmission des signaux olfactifs vers le cerveau. De plus, ces neurones présentent la particularité d'être renouvelés tout au long de la vie.

Ce projet de thèse avait donc pour but d'étudier l'impact de régimes déficient ou enrichi en AGPI n-3 (régimes LOW et HIGH, respectivement) administrés depuis la conception, sur la composition et le fonctionnement du système olfactif périphérique des jeunes souris. Nous avons évalué les effets de ces régimes sur la composition en AG, l'expression de gènes impliqués dans différentes voies cellulaires et la sensibilité de la MO de la progéniture à deux étapes clés du développement : au moment du sevrage et au début de l'âge adulte. A chaque étape, nous avons également analysé les capacités olfactives des jeunes souris.

Les régimes déséquilibrés en AGPI n-3 modifient-ils la teneur en AG des tissus olfactifs chez la souris?

Les analyses d'AG ont mis en évidence que les régimes LOW et HIGH modulent les teneurs en AGPI-LC dans la MO des souris mâles dès l'âge de 3 semaines. Le régime LOW entraîne

une augmentation de la teneur en AGPI n-6 (principalement l'AA et le DPA n-6) et une diminution de la teneur en AGPI n-3 (majoritairement le DHA) tandis que le régime HIGH induit des effets inverses. On observe également que le DHA continue de s'accumuler dans le tissu olfactif après le sevrage et ce, quel que soit le régime. L'analyse des espèces moléculaires de PL dans la MO des souris femelles âgées de 3 semaines a mis en évidence une incorporation préférentielle de l'AA et du DPA n-6 dans les PC, PE et PI du groupe LOW tandis dans le groupe HIGH, un enrichissement en DHA est observé dans ces classes de PL (Khoury *et al.*, 2020). Des effets similaires ont été observés dans la MO de souris males âgées de 8 semaines (Khoury *et al.*, en préparation).

Les AGPI estérifiés dans les PL et les plasmalogènes structurent la bicouche lipidique et modulent les propriétés physico-chimiques de la membrane (Hashimoto *et al.*, 2017). Les doubles liaisons présentes dans les AGPI leur confèrent des propriétés particulières. Ainsi, le DHA contient 6 doubles liaisons en conformation cis. Cela lui donne une forme courbée qui l'empêche d'être parfaitement aligné avec les AGS et le cholestérol contenus dans la bicouche lipidique (Hashimoto *et al.*, 2017). De ce fait, le DHA entraîne la formation de zones localement moins ordonnées au sein de la bicouche lipidique. De plus, le DHA est l'AG qui possède le plus grand volume moléculaire (355.12 Angstrom). Par rapport aux autres AGPI, cette caractéristique induit une plus grande distance intermoléculaire entre le DHA (situé en position sn-2) et les autres radicaux en positions sn-1 et sn-3, ce qui accroît la fluidité membranaire localement. Ainsi, il a été montré chez le rat qu'un apport nutritionnel quotidien de DHA augmente la fluidité membranaire des synaptosomes (Hashimoto *et al.*, 2006). L'élévation de la fluidité des membranes neuronales induite par l'incorporation du DHA dans les PL favorise la transduction du signal et la perméabilité cellulaire (Farkas *et al.*, 2000). De ce fait, une altération de la teneur en DHA dans les PL membranaires pourrait avoir des effets délétères sur le fonctionnement de protéines présentes à la membrane, comme les canaux ioniques, les RCPG ou encore sur la libération et la capture des neurotransmetteurs au niveau des synapses des cellules neuronales.

Au cours de cette étude, nous avons également analysé le profil en AG des cils olfactifs, lieu de transduction du signal olfactif dans les NSO. De manière intéressante, les résultats obtenus indiquent que le profil des AG des cils olfactifs est différent de celui de la MO. Les cils olfactifs de souris sont enrichis en AGS et AGMI et contiennent moins d'AGPI que la MO. Une étude réalisée chez le cochon avait montré que les cils olfactifs contiennent des lipides complexes (sulfo-galactosylcéramides notamment) (Lobasso *et al.*, 2010). Nos résultats sont en accord

avec ces observations car les principaux AG incorporés dans les lipides complexes de mammifères sont des AGS et des AGMI. Ces données suggèrent que les acteurs impliqués dans la transduction du signal olfactif requièrent un environnement lipidique spécifique pour fonctionner.

Récemment, plusieurs études se sont intéressées à la composition lipidique des cils des cellules de mammifères. Bien que la membrane des cils soit en continuité avec celle de la membrane plasmique, la composition lipidique des cils est différente. La membrane des cils est enrichie en glycosphingolipides comme les gangliosides GM1 et GM3, en SM, en céramide et en cholestérol (Kaiser *et al.*, 2020). Cette composition favoriserait une organisation ordonnée rappelant celle des nanodomains. Selon le modèle de la mosaïque des fluides, les nanodomains sont considérés comme étant des plateformes de signalisation enrichies en SM et en cholestérol au sein de la membrane plasmique (Nechipurenko, 2020).

L'analyse des AG des cils olfactifs des souris exposées aux régimes LOW et HIGH suggère une modulation de la teneur en AGPI dans ce compartiment cellulaire. Par rapport au régime CON, le régime LOW provoquerait une augmentation des AGPI n-6 (principalement AA) dans les cils. A l'inverse, le régime HIGH induirait une diminution de la teneur en AGPI n-6.

Le calcul de l'index global d'insaturation des AG des cils olfactifs indique que l'index du groupe LOW est plus élevé que celui du groupe CON. Cette différence est due à une teneur plus élevée en AGPI, en particulier en AGPI n-6 (AA et DPA n-6). Lors d'un déficit en DHA, le DPA n-6 est utilisé par la cellule pour assurer le rôle structural du DHA manquant. Toutefois le DPA n-6 ne possède pas autant de doubles liaisons que le DHA et son comportement au sein de la bicouche lipidique est différent. L'augmentation de la teneur en AA dans la membrane des cils pourrait également perturber les propriétés des membranes.

Nous avons réalisé des mesures d'anisotropie de fluorescence pour évaluer la fluidité membranaire des cils olfactifs. Nous avons observé une légère augmentation de la valeur de l'anisotropie de la fluorescence dans le groupe LOW, ce qui traduit une diminution de fluidité membranaire. L'accumulation d'AA et de DPA n-6 dans la membrane des cils olfactifs du groupe LOW pourrait avoir des conséquences sur les interactions entre lipides et protéines au sein de la bicouche. Toutefois, étant donné le petit nombre d'échantillons analysé dans cette étude (n= 2-3 pools), cet effet du régime LOW sur la fluidité membranaire des cils n'a pas pu être démontré

de manière significative. Il faudrait reproduire ces expériences afin de confirmer la tendance observée.

Les régimes déséquilibrés en AGPI n-3 perturbent-ils la neurogénèse et la maturation des NSO au sein de l'épithélium olfactif des souris?

La MO de mammifère contient différents types cellulaires dont des cellules basales. Il existe deux types de cellules basales : les cellules basales horizontales (CBH) et les cellules basales globulaires (CBG) considérées comme les cellules souches des NSO. Les CBH sont des cellules souches au repos qui peuvent être activées en cas d'altération sévère de l'EO. Au cours du développement ou après lésion, les CBG se divisent et se différencient en NSO grâce à l'activation de facteurs de transcription qui peuvent être utilisés comme marqueurs spécifiques de chaque stade de différenciation neuronale. Nous avons retenu certains de ces marqueurs pour évaluer les effets des régimes déséquilibrés en AGPI n-3 sur la neurogénèse et la maturation des NSO.

Les CBG sont considérées comme les cellules souches neurales de l'épithélium olfactif. Elles sont capables, en fonction du facteur de transcription exprimé, de donner naissance aux différents précurseurs neuronaux. Ainsi Sox2, Neurogenin 1 et NeuroD1 sont des facteurs de transcription qui régulent favorablement la différenciation neuronale.

GAP43 et OMP sont des protéines qui s'expriment respectivement dans les NSO immatures et les NSO matures. Les neurones nouvellement formés sont immatures. Ils expriment de manière spécifique GAP43 au niveau somatique, projettent du côté apical des dendrites et du côté basal des axones en cours de formation. Quelques jours après la genèse de ces nouveaux neurones, les cils olfactifs se forment, les axones atteignent les glomérules et les NSO matures n'expriment plus GAP43 mais expriment l'OMP ainsi que l'ensemble des acteurs de la cascade de transduction. L'utilisation de souris invalidées pour le gène OMP a permis de démontrer que OMP est impliqué dans la maturation des NSO, en particulier dans l'établissement des projections axonales vers les BO (St. John & Key, 2005; Albeanu *et al.*, 2018). OMP interagirait aussi avec ACIII pour réguler le niveau d'AMPc au cours de la transduction du signal olfactif (Nakashima *et al.*, 2020).

L'expression des RO est décalée de quelques jours par rapport au début de la différenciation neuronale. Elle intervient toutefois en amont de l'expression de l'OMP. Des études ont montré que l'expression des RO débute à E11.25 et précède la synaptogenèse de 3-4 jours chez la souris (Treolar *et al.*, 2010). Les RO sont exprimés dans les cils olfactifs mais aussi dans les axones et les cônes de croissance. Ils joueraient un rôle crucial dans le guidage axonal vers les glomérules.

La sous-unité Gs de la protéine G couplée aux RO dans les NSO immatures est impliquée dans le ciblage des axones dans la zone antérieure- postérieure des BO tandis que la sous-unité G α olf est impliquée dans la ségrégation glomérulaire des NSO matures (Nishizumi & Sakano, 2020).

Enfin, nous avons également retenu la tubuline β 3 (Tubb3, appelée aussi Tuj1) qui est un marqueur de la croissance axonale des neurones au cours de l'étape de maturation des NSO.

L'analyse de l'expression de ces marqueurs par QPCR indique que les régimes LOW et HIGH perturbent la maturation des NSO de la progéniture âgée de 8 semaines. Le régime LOW diminue l'expression de la tubuline β 3 et de l'OMP. Le régime HIGH quant à lui diminue l'expression de Olfr16 (également appelé MOR23), un des RO les plus exprimés dans la MO de souris, de la sous-unité G α olf et de la tubuline β 3.

En se basant sur les informations présentées ci-dessus, la diminution du niveau d'expression de l'OMP et de la tubuline β 3 provoquée par le régime LOW dans la MO pourrait signifier que ce régime provoque un retard de maturation et de croissance axonale des NSO. Le régime HIGH affecterait également la maturation des NSO et le guidage axonal vers les glomérules, comme le suggère la diminution du niveau d'expression du RO Olfr16 et de la tubuline β 3.

Ces hypothèses sont en accord avec des données de la littérature. En effet, des travaux réalisés chez différentes espèces (rats, primates) ont montré que la diminution de la teneur en DHA dans le cerveau et la rétine pendant le développement entraîne l'apparition de troubles neurodéveloppementaux comme des troubles de l'attention et une plus faible acuité visuelle. Les auteurs suggèrent que ces troubles pourraient être dus à un ralentissement du développement et de la maturation du cerveau et de la rétine mais également à une altération de la transmission synaptique et de la myélinisation (Davis-Bruno & Tassinari, 2011).

Plusieurs études ont mis en évidence le rôle du DHA dans la neurogénèse et la synaptogénèse (Dyall, 2015; Hashimoto *et al.*, 2017). Ainsi, Kawakita *et al.* ont montré que le DHA stimule la différenciation cellulaire en favorisant la genèse de nouveaux neurones *in vitro*. De plus, les neurones nouvellement formés acquièrent plus rapidement une morphologie mature en présence de DHA (Kawakita *et al.*, 2006). Une autre étude réalisée *in vivo* chez des rats a démontré qu'un régime enrichi en DHA administré de manière chronique augmente le nombre de neurones Neun+/Brdu+ dans la couche des cellules granulaires du gyrus denté (Kawakita *et al.*, 2006).

Toutefois, nos résultats indiquent qu'un régime enrichi en AGPI n-3 pourrait également perturber la maturation des NSO et le guidage axonal. Il a été montré que la consommation d'un régime très riche en AGPI n-3 pendant la gestation et la lactation peut avoir des effets délétères sur la croissance et le développement du cerveau et de la rétine de rat, avec pour conséquences des troubles cognitifs et visuels chez la progéniture (Weisinger *et al.*, 1996; Wainwright *et al.*, 1999). Différentes hypothèses ont été avancées pour expliquer ces effets néfastes des AGPI n-3. La consommation excessive d'AGPI n-3 pourrait induire un stress oxydant et entraîner de ce fait un processus d'apoptose (Cho & Choi, 1994). La réduction des teneurs tissulaires en AA pourrait également affecter la croissance cellulaire et les propriétés des membranes neuronales. Ces mécanismes pourraient avoir un impact sur la maturation des NSO chez les souris du groupe HIGH.

Dans la MO, les NSO sont entourés par des cellules engainantes. Ces cellules sont apparentées aux cellules gliales localisées dans le cerveau. Elles jouent un rôle dans la maturation du système olfactif périphérique en participant à la croissance axonale des NSO (Suzuki & Osumi, 2015). Des études réalisées *in vivo* ont montré que l'apport maternel en AGPI influence le profil lipidique de la microglie de la progéniture et qu'un régime déficient en AGPI n-3 modifie le phénotype de la microglie (Madore *et al.*, 2014, 2020). Ces modifications seraient responsables, au moment du sevrage, de l'altération de certaines structures cérébrales impliquées dans la mémoire. Il serait intéressant d'évaluer si les régimes maternels LOW et HIGH ont un impact sur la physiologie des cellules engainantes présentes dans la MO.

Les régimes déséquilibrés en AGPI n-3 perturbent ils le fonctionnement des NSO ?

Dans notre étude, nous avons également évalué l'impact des régimes sur la fonctionnalité du système olfactif périphérique. Dans les NSO, la transduction du signal olfactif a lieu au niveau des cils. Brièvement, lorsque l'odorant se lie au RO, la sous-unité G α olf est activée et convertit le GDP en GTP. Le GTP active l'ACIII qui transforme l'ATP intra cellulaire en AMPc. L'augmentation de la teneur intraciliaire d'AMPc provoque l'ouverture des canaux sensibles aux CNG et l'influx des ions Ca $^{2+}$ et du Na $^{+}$. Cet influx va modifier le potentiel de membrane ou potentiel récepteur des NSO. Si l'entrée des ions Ca $^{2+}$ est suffisante, les canaux chlore sensibles au calcium s'ouvrent et provoquent l'efflux des ions Cl $^{-}$, entraînant la genèse de potentiels d'action qui vont se propager le long de l'axone jusqu'aux BO. Les canaux chlore sensible au Ca $^{2+}$ sont responsables de 90% des courants induits par les odorants et donc de l'amplification du signal. Chez les mammifères, ces canaux sont constitués par des anoctamines 2.

En parallèle, lorsque la concentration intraciliaire de Ca $^{2+}$ augmente, des mécanismes de régulation et d'adaptation du signal olfactif entrent en jeu pour aboutir à la terminaison du signal. Ainsi, en se liant au Ca $^{2+}$, la calmoduline provoque à la fois la fermeture des canaux CNG et l'activation de la PDE1C responsable de la dégradation de l'AMPc. Simultanément, la CamKII est activée et inhibe l'ACIII, empêchant toute nouvelle synthèse d'AMPc. Enfin, le signal olfactif se termine lorsque les RO sont phosphorylés par la GRK3 et la PKA et se lient aux arrestines- β 2, ce qui empêche toute nouvelle activation (Kato & Touhara, 2009).

Pour mesurer l'activité fonctionnelle des NSO, nous avons utilisé une technique d'électrophysiologie appelée électro-olfactogramme (EOG). L'EOG permet d'enregistrer localement l'activité électrique d'une population de NSO en réponse à une stimulation odorante. Le courant mesuré correspond à la somme des potentiels de champ récepteur provenant des réponses individuelles des NSO. Les signaux obtenus en EOG après une stimulation odorante se traduisent pas une dépolarisation dont on peut mesurer l'amplitude et les cinétiques de réponses (Cygnar *et al.*, 2010). Cette technique permet d'évaluer le fonctionnement des différents éléments de la cascade de transduction du signal olfactif d'un ensemble de NSO dont le nombre n'est pas connu avec précision (Scott & Scott-Johnson, 2002).

En se basant sur des travaux antérieurs de l'équipe (Merle *et al.*, 2019), nous avons choisi de réaliser les enregistrements sur le cornet III en position dorso-médiane et nous avons effectué

des stimulations odorantes avec une gamme croissante de PEA (10^{-6} M à 10^{-1} M) et une gamme croissante d'ACE (10^{-6} M à 10^{-1} M). En parallèle, nous avons mesuré le niveau d'expression des gènes impliqués dans la transduction et la terminaison du signal olfactif afin de pouvoir interpréter les enregistrements d'EOG.

Les résultats obtenus montrent que chez les souris âgées de 8 semaines, le régime LOW altère les réponses des NSO aux odorants (amplitude et vitesse de dépolarisation) et provoque une diminution de l'expression des gènes OMP, PDE1C et RTP2 dans la MO.

Le rôle précis de l'OMP n'est pas encore clairement établi mais plusieurs études suggèrent que dans les NSO matures, l'OMP interagit directement avec des éléments de la cascade de transduction (Lee *et al.*, 2011; Dibattista & Reisert, 2016; Nakashima *et al.*, 2020). Plusieurs mécanismes d'interactions ont été potentiellement identifiés. L'OMP participerait notamment à la régulation du niveau intraciliaire de Ca^{2+} via l'échangeur Na^{+}/Ca^{2+} en modulant l'action de la calmoduline dans les cils (Kwon *et al.*, 2009). Par ce mécanisme, l'OMP contribuerait à la terminaison du signal olfactif et au retour à l'état basal des NSO.

De manière intéressante, des expériences de patch clamp ont mis en évidence qu'en présence d'IBMX, l'activité spontanée des NSO K.O. pour l'OMP est similaire à celle des NSO wild-type (WT). L'IBMX est un inhibiteur des phosphodiésterases qui empêche la dégradation de l'AMPc. Des expériences de patch clamp en condition « low calcium » extracellulaire ont également montré que les cinétiques de réponse des NSO K.O. pour l'OMP à des odorants sont plus faibles que celles des NSO WT. Par contre, l'effet de l'IBMX est similaire quel que soit le type de NSO. L'ensemble de ces résultats suggère que l'OMP interviendrait préférentiellement en amont de la cascade de transduction, par exemple au niveau de l'ACIII, plutôt qu'au niveau des canaux CNG ou CaCl (Reisert *et al.*, 2007; Lee *et al.*, 2011; Dibattista & Reisert, 2016). Des travaux plus récents proposent une nouvelle hypothèse. L'OMP possède, au sein de sa séquence d'acides aminés, deux sites de liaison à l'AMPc possibles. La liaison de l'AMPc à l'OMP pourrait ainsi être impliquée dans l'arrêt du signal olfactif en réduisant la teneur en AMPc intraciliaire (Nakashima *et al.*, 2020).

De plus, des enregistrements EOG réalisés chez des souris K.O. pour le gène *OMP* ont montré que les réponses des NSO qui n'expriment pas l'OMP présentent une amplitude et une cinétique de réponse plus faible que les NSO exprimant l'OMP (Dibattista & Reisert, 2016). Ces effets sont similaires à ceux que nous avons observés dans le groupe LOW.

Ces données de la littérature permettent de supposer que la diminution de l'expression de l'OMP que nous avons observée pourrait participer à l'altération des signaux EOG enregistrés dans le groupe LOW. Cette diminution pourrait résulter d'une perturbation des processus de maturation des NSO et/ou d'une réduction du nombre de NSO matures dans la MO.

Si on retient l'hypothèse d'un rôle en amont de la cascade de transduction du signal (« coopération » avec l'ACIII), la réduction du niveau d'expression de l'OMP dans la MO peut aboutir à une plus faible amplitude des réponses électrophysiologiques comme observé dans le groupe LOW et une cinétique de réponse plus faible. Par contre, si on retient l'hypothèse d'une implication de l'OMP dans la terminaison du signal (liaison de l'AMPc ou modulation de l'extrusion de Ca^{2+}), la diminution du niveau d'expression de l'OMP dans la MO devrait entraîner un allongement du signal. Nous avons effectivement observé que les vitesses de repolarisation courte et longue sont moins rapides dans le groupe LOW que dans le groupe CON mais ces effets ne sont pas significatifs (données non présentées).

De manière intéressante, la diminution de l'expression de l'OMP s'accompagne d'une diminution de l'expression de PDE1C. PDE1C est une enzyme activée par la formation du complexe Ca^{2+} /Calmoduline et dont le rôle est de dégrader l'AMPc. Elle participe à la terminaison du signal olfactif en entraînant la fermeture des canaux CNG dans les cils des NSO. Dans la MO des souris du groupe LOW, la diminution de l'expression de PDE1C pourrait également participer à la perturbation des réponses EOG. En effet, dans une étude menée chez des souris K.O. pour le gène PDE1C, Cygnar et al. ont montré que les réponses EOG présentaient des amplitudes et des cinétiques de réponses plus faibles et une vitesse de terminaison du signal plus rapide (Cygnar *et al.*, 2010). Le profil des réponses EOG enregistrées dans le groupe LOW s'accorde avec ces observations, bien que nous n'ayons pas observé d'accélération de la terminaison du signal dans notre étude.

Une autre perturbation pourrait également contribuer à altérer la fonctionnalité des NSO du groupe LOW. En effet, nous avons observé que le niveau d'expression de RTP2 est diminué dans ce groupe. Tout comme RTP1, RTP2 est une protéine chaperonne chargée d'adresser les RO à la membrane (Mainland & Matsunami, 2012). Chez des souris K.O. pour RTP1 et RTP2, le défaut d'adressage à la membrane des RO empêche la majorité des NSO de devenir matures et donc fonctionnels (Bush & Hall, 2008; Sharma *et al.*, 2017; Ikegami *et al.*, 2019).

D'autres processus que nous n'avons pas explorés pourraient également être à l'origine de l'altération des signaux EOG chez les souris exposées au régime LOW. De nombreuses études ont démontré que les AGPI incorporés dans les PL membranaires peuvent interagir avec les protéines transmembranaires comme les canaux ioniques et les RCPG. Si les forces au sein de la bicouche sont modifiées, cela peut affecter les interactions lipides-protéines et de ce fait, le fonctionnement des protéines membranaires (Poveda *et al.*, 2014; Cordero-Morales & Vásquez, 2018).

A ce jour, les mécanismes par lesquels les AGPI affectent le fonctionnement des canaux ioniques ne sont pas connus (Elinder & Liin, 2017). Toutefois, certains AGPI hydrolysés sous l'action de la PLA2 pourraient influencer la signalisation olfactive. Ainsi, en utilisant la technique de patch clamp sur des NSO de rats, une équipe a montré que l'AA et le DHA provoquent une inhibition faible et transitoire des courants Na^+ tandis que les courants K^+ sont fortement perturbés (activation et cinétique de réponse plus lentes) (Seebunkert & Lynch, 2002).

Au cours de ce projet, nous n'avons pas évalué l'impact des régimes sur le fonctionnement des canaux CNG et des canaux chlore sensible au Ca^{2+} présents dans la membrane des NSO. Bien que les résultats des analyses d'EOG ainsi que les données de biologie moléculaire obtenus dans le groupe LOW ne semblent pas en faveur d'une altération du fonctionnement des canaux CNG, nous ne pouvons pas l'exclure. Les canaux CNG sensibles à l'AMPc sont à l'origine de l'entrée de Ca^{2+} et Na^+ et sont responsables de 10% des courants induits par les odorants tandis que les canaux chlore sensibles au Ca^{2+} fournissent 90% des courants induits, assurant ainsi une amplification robuste et stable du signal (Reisert & Reingruber, 2019). Réaliser des expériences de patch clamp sur cellules entières et mesurer l'activité basale des NSO de souris LOW et HIGH ainsi que leurs réponses aux odorants pourrait apporter des éléments de réponse concernant la fonctionnalité des canaux ioniques.

Les régimes déséquilibrés en AGPI n-3 modifient ils la perception olfactive des souris ?

Quelques études ont mis en évidence qu'une alimentation déséquilibrée en lipides peut provoquer des troubles olfactifs chez les rongeurs. Ainsi Thiebaud et al. ont montré qu'un régime hyper-lipidique administré à des souris adultes affecte leurs capacités olfactives et modifie

l'anatomie et la fonctionnalité du système olfactif périphérique (Thiebaud *et al.*, 2014) . Récemment, Merle et al. ont montré qu'une alimentation maternelle riche en sucre et en gras altère la perception des odeurs chez la progéniture au moment du sevrage (Merle *et al.*, 2019) . La consommation d'un régime alimentaire normo-lipidique déficient en AGPI n-3 sur plusieurs générations altère également les capacités olfactives des rats et modifie en particulier la composition lipidique de structures centrales impliquées dans le traitement de l'information olfactive et dans les processus de mémoire (Greiner *et al.*, 2001; Hichami *et al.*, 2007).

Dans notre étude, les capacités olfactives des souris âgées de 3 et 8 semaines ont été évaluées à l'aide d'un test de flairage par pléthysmographie mis en place précédemment au laboratoire (Merle *et al.*, 2019). Ce test permet de déterminer le seuil de détection d'une odeur, défini comme la plus petite intensité perçue pour une odeur donnée. Le PEA, une molécule ayant une odeur de rose pour l'Homme, a été utilisé comme odorant dans ce test.

Le calcul du z-index, basé sur les mesures d'amplitude et de fréquence respiratoires, a mis en évidence une modification du seuil de détection des souris LOW âgées de 3 semaines sans que cela ne soit associé à une perturbation de l'expression des gènes impliqués dans la cascade de transduction du signal olfactif ou à une altération des réponses électrophysiologiques de la MO. Les résultats obtenus à l'âge de 8 semaines sont différents. En effet, nous montrons qu'en présence de 10^{-9} M de PEA, les souris des 3 groupes (CON, LOW et HIGH) détectent l'odorant. De manière surprenante, les souris LOW détectent toujours la présence de PEA aux concentrations de 10^{-8} M et 10^{-7} M et les souris HIGH uniquement en présence de PEA 10^{-8} M. Ces résultats peuvent paraître étonnants car on n'observe pas de modulation du seuil de détection du PEA par les régimes. Ces données suggèrent que dès la première présentation de PEA, les souris CON analysent rapidement l'odeur et arrêtent de flairer le PEA à 10^{-8} M et 10^{-7} M car aucune valeur hédonique n'est associée à la présentation de l'odorant. En revanche, les souris LOW et HIGH auraient besoin de plus de temps pour réaliser un échantillonnage de l'odorant et plusieurs ajustements/flairages seraient nécessaires pour analyser l'odeur avant de s'en détourner. Ces résultats pourraient également signifier que les souris LOW et HIGH s'adaptent moins vite à l'odeur du PEA.

De nombreuses études se sont intéressées au comportement de flairage au cours d'une tâche olfactive. C'est un comportement complexe qui peut aussi être modulé par des fonctions centrales comme l'attention, l'éveil et l'intérêt que va susciter l'odeur (Hegoburu *et al.*, 2011). Le test de flairage par pléthysmographie repose sur le principe qu'il existe un lien indissociable

entre le flairage et la perception des odeurs chez les rongeurs. De manière générale, un cycle respiratoire est composé d'une phase d'inspiration et d'une phase d'expiration permettant l'échantillonnage olfactif de l'environnement. Au niveau de la MO, la détection des odorants dépend aussi des propriétés physico-chimiques des molécules, du flux d'air pénétrant dans les cavités nasales et de la répartition topographique des RO. Ainsi la perception des odeurs peut être influencée par la respiration. Si l'amplitude et/ou la fréquence du flairage varient, l'intensité à laquelle l'odeur est perçue est également modifiée (Youngentob, 2005; Wesson *et al.*, 2008).

Lors des expériences de pléthysmographie, nous avons remarqué que les souris âgées de 8 semaines explorent davantage le dispositif expérimental mais cela n'a pas été quantifié. Ce comportement exploratoire, associé à un flairage dont l'amplitude et la fréquence basale sont plus élevées, permet probablement aux souris adultes de détecter la présence de PEA à des concentrations très faibles (10^{-9} M).

D'autres tests permettent d'évaluer les capacités olfactives des rongeurs. Pour évaluer les capacités de discrimination des souris âgées de 8 semaines, nous avons mis en oeuvre le test d'habituation-déshabituaiton. Tout comme le test de flairage par pléthysmographie, ce test est basé sur la curiosité naturelle des souris à explorer une nouvelle odeur. En se basant sur des travaux antérieurs réalisés dans l'équipe, nous avons choisi d'exposer les souris à l'odeur de PEA et d'ACE. Nos résultats indiquent que les capacités de discrimination olfactive des souris adultes ne sont pas affectées par les régimes déséquilibrés en AGPI n-3.

Ces résultats ne sont pas en accord avec les études de Greiner et Hichami qui avaient mis en évidence un effet délétère du régime déficient en AGPI n-3 (Greiner *et al.*, 2001; Hichami *et al.*, 2007). Plusieurs éléments pourraient expliquer les différences observées. Le test d'habituation-déshabituaiton que nous avons utilisé ne nécessite pas un apprentissage associé à un système de récompense. Les circuits neuronaux mis en jeu ne sont donc pas les mêmes que ceux impliqués dans les tests utilisés par Greiner et Hichami qui font intervenir des processus d'apprentissage et de mémoire. De plus, les études de Greiner et Hichami ont été réalisées sur des rats males de la deuxième génération. La durée de l'exposition au régime déficient en AGPI n-3 était de ce fait plus longue que dans notre modèle expérimental. Enfin les régimes déficients en AGPI n-3 utilisés par ces auteurs étaient soit très fortement déficient soit dépourvu en AGPI n-3.

Par ailleurs, comment expliquer qu'à l'âge de 3 semaines, le seuil de détection du PEA soit plus élevé chez les souris du groupe LOW sans qu'aucune perturbation majeure ne soit observée au niveau périphérique (maturation des NSO, réponse fonctionnelle des NSO, expression des composants de la cascade de transduction) ?

Cette modification de la perception olfactive résulte peut-être d'un défaut d'attention ou de motivation chez ces souris, comme les études de Greiner et Hichami le suggèrent. Pour vérifier cette hypothèse, il serait intéressant de réaliser le test de nourriture enfouie qui permet d'évaluer les capacités olfactives et la motivation des souris.

L'anxiété pourrait également influencer le comportement olfactif des souris du groupe LOW. En effet, de nombreuses études ont démontré qu'un régime déficient en AGPI n-3, et plus particulièrement en DHA, favorise l'apparition de troubles neuro-comportementaux comme la dépression et l'anxiété (Müller *et al.*, 2015; Larrieu & Layé, 2018). Ces troubles seraient provoqués, entre autres, par une perturbation de la libération des neurotransmetteurs et de la transmission synaptique. Le test de la nage forcée et/ou le test du labyrinthe en croix surélevée pourrait être mis en œuvre pour évaluer l'humeur ainsi que l'anxiété chez la progéniture âgée de 3 semaines.

Au cours de notre étude, nous avons constaté que le régime LOW perturbe le fonctionnement du système olfactif périphérique des souris adultes sans que leurs capacités de détection et de discrimination olfactives ne soient affectées (même s'il est possible que ces souris aient besoin de plus de temps pour échantillonner l'odeur).

Cette observation présente des similitudes avec les résultats de travaux qui se sont intéressés au maintien du sens olfactif chez des animaux dont l'épithélium olfactif a été lésé ou chez des souris génétiquement modifiées.

Après lésion de l'épithélium olfactif, les souris sont en effet capables de détecter 45 % des odorants qui leur sont présentés (Youngentob & Schwob, 2006). Il a également été démontré que les souris K.O. pour le gène OMP présentent des troubles olfactifs mais ne sont pas anosmiques (Lee *et al.*, 2011; Kass *et al.*, 2013). Ces souris passent plus de temps à identifier la première odeur lors d'un test d'habituation – déshabituation. Elles ne « s'habituent » pas clairement à l'odeur mais arrivent à discriminer la deuxième odeur (Kass *et al.*, 2013). Des études

suggèrent que le maintien des capacités olfactives observées chez ces souris serait dû à la présence supplémentaire de synapses axodendritiques provenant des NSO dans les BO (Griff *et al.*, 2000; Kass *et al.*, 2013).

Il est établi que les NSO matures forment des synapses avec les neurones intrinsèques des BO au niveau de nombreux glomérules. Les caractéristiques du signal olfactif (intensité et qualité) sont intégrées au niveau bulbaire puis transmises au niveau central. Une étude récente a mis en évidence une modification de la carte d'activation neuronale au niveau des glomérules olfactifs chez les souris K.O. pour l'OMP (Nakashima *et al.*, 2020). Dans notre étude, le niveau d'expression de l'OMP chez les souris du groupe LOW est diminué mais pas invalidé. De ce fait, les connexions épithélio-bulbaires ne sont peut-être pas suffisamment impactées pour altérer la perception olfactive de ces souris.

Les régimes déséquilibrés en AGPI n-3 ont-ils un impact sur les cytokines impliquées dans l'inflammation ?

De nombreuses études nutritionnelles et épidémiologiques menées chez les rongeurs et l'Homme suggèrent que les régimes enrichis en AGPI n-3 à longue chaîne protègent les tissus contre l'inflammation. Ces AGPI moduleraient l'inflammation *via* différents mécanismes. Ils peuvent interagir directement avec des facteurs de transcription tels que PPAR et NFκB et inhiber ainsi la transcription de gènes codant pour des cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-1β, l'IL-6 et le TNF-α. L'EPA et le DHA sont par ailleurs les précurseurs de divers métabolites comme les résolvines et les marésines, impliqués dans la régulation et la résolution de l'inflammation (Joffre *et al.*, 2019).

Nous sommes donc intéressés à l'impact des régimes déséquilibrés en AGPI n-3 sur l'expression de différentes cytokines. Dans la MO des souriceaux âgés de 3 semaines, nous avons observé que le régime HIGH diminue l'expression de TNFα, un marqueur de l'inflammation, mais ne modifie pas l'expression de cytokines pro-inflammatoires comme IL-1β et IL-6 ou anti-inflammatoires comme IL-10 et IL-13. A l'âge de 8 semaines, le régime HIGH augmente l'expression d'IL-10, une cytokine anti-inflammatoire, mais n'affecte pas les autres marqueurs analysés.

Ces résultats sont en faveur d'un effet protecteur du régime HIGH mais ils soulèvent plusieurs questions. Comment expliquer que les cibles modulées ne soient pas similaires à l'âge de 3 et de 8 semaines ? Par quels mécanismes le régime HIGH module-t-il l'expression de ces cytokines ?

On sait que les AGPI-LC n-3 doivent être à l'état libre pour pouvoir se lier aux facteurs de transcription PPAR et NF κ B et bloquer ainsi l'expression des cytokines pro-inflammatoires. Cela nécessite une libération des AGPI n-3 estérifiés dans les PL par les PLA. Toutefois, les analyses de QPCR n'ont pas mis en évidence une augmentation de l'expression des PLA ni d'autres enzymes impliquées dans le métabolisme de lipides dans la MO.

Afin de comprendre les mécanismes impliqués, plusieurs études complémentaires pourraient être mises en œuvre. En premier lieu, pour confirmer les résultats de QPCR, il serait intéressant de mesurer les taux des marqueurs de l'inflammation dans la MO en utilisant d'autres techniques comme les dosages ELISA. Il pourrait aussi être intéressant de quantifier l'expression d'enzymes comme les COX et les LOX impliquées dans la synthèse des dérivés de l'AA, du DHA et de l'EPA. En complément, nous pourrions doser ces dérivés lipidiques (oxylipines) dans la MO par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse pour rechercher leur éventuelle implication dans les effets observés. Enfin, nous pourrions étudier le potentiel protecteur du régime HIGH en situation inflammatoire.

Dans cet objectif, nous avons réalisé une expérience préliminaire dans le but de mettre au point les conditions expérimentales permettant d'induire une réaction inflammatoire au niveau de la MO. Nous avons injecté à quelques souris contrôles du LPS à la concentration de 250 mg/kg p.c par voie intrapéritonéale. Les souris ont été sacrifiées 2h30 après l'injection et les MO ont été prélevées pour analyser par QPCR l'expression de cytokines pro- et anti-inflammatoires. Dans ces conditions, nous avons observé une augmentation importante des marqueurs pro-inflammatoires, signes d'une inflammation locale dans la MO. Faute de temps, nous n'avons pas pu poursuivre cette étude mais il serait très intéressant de confirmer ces résultats sur un groupe plus important d'animaux. Si tel est le cas, nous pourrions utiliser ce protocole expérimental pour évaluer si le régime enrichi en AGPI n-3 a la capacité d'atténuer les effets inflammatoires provoqués par le LPS au niveau de la MO.

Ces différentes études permettraient d'approfondir les connaissances quant aux effets protecteurs des AGPI n-3 vis-à-vis de l'inflammation dans la MO.

PARTIE 5

Conclusion & Perspectives

L'ensemble de ces travaux de thèse a permis de démontrer que l'administration de régimes déséquilibrés en AGPI n-3 au cours de la période périnatale et jusqu'au début de l'âge adulte perturbe la physiologie du système olfactif périphérique de la progéniture. Nous avons observé que les régimes déficient et enrichi en AGPI n-3 modifient de manière significative les teneurs en AG de la MO et retardent la maturation des NSO mais n'affectent pas la neurogénèse. De plus, le régime déficient en AGPI n-3 altère le traitement de l'information olfactive au niveau périphérique en réduisant l'expression de certains acteurs de la cascade de transduction du signal olfactif. Malgré ces modifications, les capacités olfactives des jeunes souris ne sont pas altérées.

Pour prolonger ce travail, il serait intéressant d'explorer les mécanismes moléculaires sous-jacents, en recherchant notamment si des facteurs de transcription tels que PPAR, RXR ou NFκB sont impliqués dans les effets observés. Une analyse approfondie des radeaux lipidiques permettrait également d'évaluer si ces domaines membranaires impliqués dans la signalisation cellulaire sont affectés par les régimes déséquilibrés en AGPI n-3. A l'échelle de la cellule, nous pourrions analyser plus spécifiquement les réponses individuelles de NSOs par la technique d'enregistrement en patch-clamp. Ces études pourraient être menées sur des souris transgéniques dont tous les NSOs exprimant le RO olfr16 (MOR23) sont marqués par la GFP. En effet, nos résultats ont mis en évidence une altération de l'expression de ce récepteur dans la MO des souris exposées au régime HIGH.

Il serait également très intéressant de comprendre comment les modifications provoquées au niveau périphérique par le régime déficient en AGPI n-3 sont compensées au niveau central pour assurer la continuité du sens olfactif. L'implication des BO dans ce processus mériterait d'être examinée. L'analyse des connexions épithélio-bulbaires pourrait peut-être permettre d'apporter des éléments de réponse à cette question.

Enfin, les conséquences de la consommation à plus long terme et sur plusieurs générations du régime déficient en AGPI n-3 sur la physiologie du système olfactif périphérique pourraient être étudiées. Des études ont montré que l'administration de ce type de régime à des souris pendant 2 générations provoque une altération de leurs capacités olfactives (Greiner *et al.*, 2001; Hichami *et al.*, 2007). Des modifications observées au niveau central pourraient être à l'origine de ces perturbations mais il n'est pas exclu que l'accumulation de changements au niveau périphérique y contribue également.

De nombreuses études ont démontré que le système olfactif a la capacité de présenter un certain degré de plasticité, tant à la périphérie qu'au niveau des structures centrales impliquées dans l'olfaction. L'importance de cette plasticité dans des conditions normales et pathologiques est encore largement méconnue. Elle permet aux individus d'évoluer dans un environnement très riche sur le plan sensoriel mais elle peut aussi être perturbée par divers facteurs. Les recherches menées ces dernières années tendent à démontrer que l'état nutritionnel et hormonal des individus peut influencer le fonctionnement des structures olfactives. Dans ce contexte, nos travaux apportent de nouvelles connaissances sur l'impact d'un déséquilibre alimentaire en AGPI n-3 sur la physiologie du système olfactif périphérique, notamment au cours de la période neurodéveloppementale. La littérature concernant le rôle physiologique des AGPI n-3 est riche ; elle souligne en particulier leur importance dans le développement et le fonctionnement du cerveau et de la rétine chez l'Homme et les rongeurs. Jusqu'à présent, les tissus neurosensoriels n'ont pas bénéficié du même engouement. Pourtant, l'odorat joue un rôle essentiel dans la vie quotidienne, en particulier pour déclencher la prise alimentaire ou détecter d'éventuels dangers. L'éventuelle vulnérabilité du système olfactif face à des déséquilibres nutritionnels mérite donc d'être évaluée de manière approfondie car une altération du sens de l'olfaction pourrait conduire, entre autres, à des choix alimentaires inadéquats.

Bibliographie

- Ache, B.W. (2010) Odorant-specific modes of signaling in mammalian olfaction. *Chem. Senses*, **35**, 533–539.
- Ache, B.W. & Young, J.M. (2005) Olfaction: diverse species, conserved principles. *Neuron*, **48**, 417–430.
- Aïd, S., Vancassel, S., Poumès-Ballihaut, C., Chalon, S., Guesnet, P., & Lavielle, M. (2003) Effect of a diet-induced n-3 PUFA depletion on cholinergic parameters in the rat hippocampus. *J. Lipid Res.*, **44**, 1545–1551.
- Aimé, P., Palouzier-Paulignan, B., Salem, R., Al Koborssy, D., Garcia, S., Duchamp, C., Romestaing, C., & Julliard, A.K. (2014) Modulation of olfactory sensitivity and glucose-sensing by the feeding state in obese Zucker rats. *Front. Behav. Neurosci.*, **8**, 326.
- Albeanu, D.F., Provost, A.C., Agarwal, P., Soucy, E.R., Zak, J.D., & Murthy, V.N. (2018) Olfactory marker protein (OMP) regulates formation and refinement of the olfactory glomerular map. *Nat. Commun.*, **9**, 5073.
- Alberts, B., Johnson, A., & Lewis, J. et al (2002) The Lipid Bilayer. In *Molecular Biology of the Cell, 4th Edition*. New York: Garland Science.
- Alessandri, J.-M., Guesnet, P., Vancassel, S., Astorg, P., Denis, I., Langelier, B., Aïd, S., Poumès-Ballihaut, C., Champeil-Potokar, G., & Lavielle, M. (2004) Polyunsaturated fatty acids in the central nervous system: evolution of concepts and nutritional implications throughout life. *Reprod Nutr Dev*, **44**, 509–538.
- Anderson, G.J., Neuringer, M., Lin, D.S., & Connor, W.E. (2005) Can prenatal N-3 fatty acid deficiency be completely reversed after birth? Effects on retinal and brain biochemistry and visual function in rhesus monkeys. *Pediatr. Res.*, **58**, 865–872.
- Anderson, R.E. & Maude, M.B. (1970) Lipids of ocular tissues. 6. Phospholipids of bovine rod outer segments. *Biochemistry*, **9**, 3624–3628.
- Anses (2015) Apports en acides gras de la population vivant en France et comparaison aux apports nutritionnels conseillés définis en 2010.
- Aoudé, I. (2012) Effets de l'environnement sur la plasticité des neurones olfactifs durant le développement : étude anatomique, moléculaire, physiologique et comportementale.
- Bascoul-Colombo, C., Guschina, I.A., Maskrey, B.H., Good, M., O'Donnell, V.B., & Harwood, J.L. (2016) Dietary DHA supplementation causes selective changes in phospholipids from different brain regions in both wild type mice and the Tg2576 mouse model of Alzheimer's disease. *Biochim. Biophys. Acta*, **1861**, 524–537.

- Bazan, N.G. (2009) Neuroprotectin D1-mediated anti-inflammatory and survival signaling in stroke, retinal degenerations, and Alzheimer's disease. *J. Lipid Res.*, **50 Suppl**, S400-405.
- Bazinet, R.P. & Layé, S. (2014) Polyunsaturated fatty acids and their metabolites in brain function and disease. *Nat Rev Neurosci*, **15**, 771–785.
- Belzung, C., Leguisquet, A.M., Barreau, S., Delion-Vancassel, S., Chalon, S., & Durand, G. (1998) Alpha-linolenic acid deficiency modifies distractibility but not anxiety and locomotion in rats during aging. *J. Nutr.*, **128**, 1537–1542.
- Berg, J., Tymoczko, J., & Stryer, L. (2002) There Are Three Common Types of Membrane Lipids. In *Biochemistry*, New York: W H Freeman. edn.
- Bervers, E.M., Comfurius, P., Dekkers, D.W., & Zwaal, R.F. (1999) Lipid translocation across the plasma membrane of mammalian cells. *Biochim. Biophys. Acta*, **1439**, 317–330.
- Bienias, K., Fiedorowicz, A., Sadowska, A., Prokopiuk, S., & Car, H. (2016) Regulation of sphingomyelin metabolism. *Pharmacol Rep*, **68**, 570–581.
- Birch, E., Birch, D., Hoffman, D., Hale, L., Everett, M., & Uauy, R. (1993) Breast-feeding and optimal visual development. *J Pediatr Ophthalmol Strabismus*, **30**, 33–38.
- Blasbalg, T.L., Hibbeln, J.R., Ramsden, C.E., Majchrzak, S.F., & Rawlings, R.R. (2011) Changes in consumption of omega-3 and omega-6 fatty acids in the United States during the 20th century. *Am J Clin Nutr*, **93**, 950–962.
- Bobkov, Y.V. & Ache, B.W. (2005) Pharmacological properties and functional role of a TRP-related ion channel in lobster olfactory receptor neurons. *J. Neurophysiol.*, **93**, 1372–1380.
- Borgmann-Winter, K., Willard, S.L., Sinclair, D., Mirza, N., Turetsky, B., Berretta, S., & Hahn, C.-G. (2015) Translational potential of olfactory mucosa for the study of neuropsychiatric illness. *Transl. Psychiatry*, **5**, e527.
- Bourre, J.M. (1989) Nature, origin and role of fatty acids of the nervous system: an essential fatty acid, an alpha-linolenic acid, changing the structure and the cerebral function. *Bull. Acad. Natl. Med.*, **173**, 1137–1151.
- Brennan, P.A. & Zufall, F. (2006) Pheromonal communication in vertebrates. *Nature*, **444**, 308–315.
- Breslow, D.K. & Weissman, J.S. (2010) Membranes in balance : mechanisms of sphingolipid homeostasis. *Mol. Cell*, **40**, 267–279.

- 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. *J. Comp. Neurol.*, **524**, 199–209.
- Brunjes, P.C. & Frazier, L.L. (1986) Maturation and plasticity in the olfactory system of vertebrates. *Brain Res.*, **396**, 1–45.
- Buck, L. & Axel, R. (1991) A novel multigene family may encode odorant receptors: a molecular basis for odor recognition. *Cell*, **65**, 175–187.
- Buck, L.B. (1996) Information coding in the vertebrate olfactory system. *Annu. Rev. Neurosci.*, **19**, 517–544.
- Bush, C.F. & Hall, R.A. (2008) Olfactory receptor trafficking to the plasma membrane. *Cell. Mol. Life Sci.*, **65**, 2289–2295.
- Calder, P.C. (2015) Functional roles of fatty acids and their effects on human health. *JPEN J Parenter Enteral Nutr*, **39**, 185–325.
- Cao, D., Kevala, K., Kim, J., Moon, H.-S., Jun, S.B., Lovinger, D., & Kim, H.-Y. (2009) Docosahexaenoic acid promotes hippocampal neuronal development and synaptic function. *J. Neurochem.*, **111**, 510–521.
- Carrié, I., Clément, M., de Javel, D., Francès, H., & Bourre, J.M. (2000) Specific phospholipid fatty acid composition of brain regions in mice. Effects of n-3 polyunsaturated fatty acid deficiency and phospholipid supplementation. *J. Lipid Res.*, **41**, 465–472.
- Casares, D., Escribá, P.V., & Rosselló, C.A. (2019) Membrane lipid composition : effect on membrane and organelle structure, function and compartmentalization and therapeutic avenues. *Int. J. Mol. Sci.*, **20**, 2167.
- Challis, R.C., Tian, H., Wang, J., He, J., Jiang, J., Chen, X., Yin, W., Connelly, T., Ma, L., Yu, C.R., Pluznick, J.L., Storm, D.R., Huang, L., Zhao, K., & Ma, M. (2015) An Olfactory cilia pattern in the mammalian nose ensures high sensitivity to odors. *Curr. Biol.*, **25**, 2503–2512.
- Chalon, S. (2006) Omega-3 fatty acids and monoamine neurotransmission. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids*, **75**, 259–269.
- Chen, H.-F. & Su, H.-M. (2013) Exposure to a maternal n-3 fatty acid-deficient diet during brain development provokes excessive hypothalamic-pituitary-adrenal axis responses to stress and behavioral indices of depression and anxiety in male rat offspring later in life. *J. Nutr. Biochem.*, **24**, 70–80.

- Chianese, R., Coccorello, R., Viggiano, A., Scafuro, M., Fiore, M., Coppola, G., Operto, F.F., Fasano, S., Laye, S., Pierantoni, R., & Meccariello, R. (2018) Impact of dietary fats on brain functions. *Curr Neuropharmacol*, **16**, 1059–1085.
- Childs, C.E., Romeu-Nadal, M., Burdge, G.C., & Calder, P.C. (2008) Gender differences in the n-3 fatty acid content of tissues. *Proc. Nutr. Soc.*, **67**, 19–27.
- Cho, S.H. & Choi, Y.S. (1994) Lipid peroxidation and antioxidant status is affected by different vitamin E levels when feeding fish oil. *Lipids*, **29**, 47–52.
- Choi, J., Yin, T., Shinozaki, K., Lampe, J.W., Stevens, J.F., Becker, L.B., & Kim, J. (2018) Comprehensive analysis of phospholipids in the brain, heart, kidney, and liver: brain phospholipids are least enriched with polyunsaturated fatty acids. *Mol. Cell. Biochem.*, **442**, 187–201.
- Clandinin, M.T., Foot, M., & Robson, L. (1983) Plasma membrane : can its structure and function be modulated by dietary fat? *Comp. Biochem. Physiol. B*, **76**, 335–339.
- Cordain, L., Eaton, S.B., Sebastian, A., Mann, N., Lindeberg, S., Watkins, B.A., O’Keefe, J.H., & Brand-Miller, J. (2005) Origins and evolution of the Western diet: health implications for the 21st century. *Am J Clin Nutr*, **81**, 341–354.
- Cordero-Morales, J.F. & Vásquez, V. (2018) How lipids contribute to ion channel function, a fat perspective on direct and indirect interactions. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **51**, 92–98.
- Cournia, Z., Allen, T.W., Andricioaei, I., Antonny, B., Baum, D., Brannigan, G., Buchete, N.-V., Deckman, J.T., Delemotte, L., Del Val, C., Friedman, R., Gkeka, P., Hege, H.-C., Hénin, J., Kasi-mova, M.A., Kolocouris, A., Klein, M.L., Khalid, S., Lemieux, M.J., Lindow, N., Roy, M., Selent, J., Tarek, M., Tofoleanu, F., Vanni, S., Urban, S., Wales, D.J., Smith, J.C., & Bondar, A.-N. (2015) Membrane protein structure, function, and dynamics: a perspective from experiments and theory. *J. Membr. Biol.*, **248**, 611–640.
- 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**, 339–352.
- Cygnar, K.D., Stephan, A.B., & Zhao, H. (2010) Analyzing responses of mouse olfactory sensory neurons using the air-phase electroolfactogram recording. *J. Vis. Exp*, 1850.
- Dangi, B., Obeng, M., Nauroth, J.M., Teymourlouei, M., Needham, M., Raman, K., & Arterburn, L.M. (2009) Biogenic synthesis, purification, and chemical characterization of anti-inflammatory resolvins derived from docosapentaenoic acid (DPA n-6). *J. Biol. Chem.*, **284**, 14744–14759.

- Davis-Bruno, K. & Tassinari, M.S. (2011) Essential fatty acid supplementation of DHA and ARA and effects on neurodevelopment across animal species: a review of the literature. *Birth Defects Research Part B: Developmental and Reproductive Toxicology*, **92**, 240–250.
- Deamer, D. (2017) The Role of Lipid Membranes in Life's Origin. *Life*, **7**.
- Desai, A.J. & Miller, L.J. (2018) Changes in the plasma membrane in metabolic disease: impact of the membrane environment on G protein-coupled receptor structure and function. *Br J Pharmacol*, **175**, 4009–4025.
- Di Miceli, M., Bosch-Bouju, C., & Layé, S. (2020) PUFA and their derivatives in neurotransmission and synapses: a new hallmark of synaptopathies. *Proc Nutr Soc*, **79**, 388–403.
- Dibattista, M., Al Koborssy, D., Genovese, F., & Reisert, J. (2021) The functional relevance of olfactory marker protein in the vertebrate olfactory system: a never-ending story. *Cell Tissue Res*, **383**, 409–427.
- Dibattista, M. & Reisert, J. (2016) The Odorant Receptor-Dependent Role of Olfactory Marker Protein in Olfactory Receptor Neurons. *J Neurosci*, **36**, 2995–3006.
- Dong, Y., Xu, M., Kalueff, A.V., & Song, C. (2018) Dietary eicosapentaenoic acid normalizes hippocampal omega-3 and 6 polyunsaturated fatty acid profile, attenuates glial activation and regulates BDNF function in a rodent model of neuroinflammation induced by central interleukin-1 β administration. *Eur J Nutr*, **57**, 1781–1791.
- Doucette, R. (1993) Glial progenitor cells of the nerve fiber layer of the olfactory bulb : Effect of astrocyte growth media. *J. Neurosci. Res.*, **35**, 274–287.
- Dragano, N.R.V., Solon, C., Ramalho, A.F., de Moura, R.F., Razolli, D.S., Christiansen, E., Azevedo, C., Ulven, T., & Velloso, L.A. (2017) Polyunsaturated fatty acid receptors, GPR40 and GPR120, are expressed in the hypothalamus and control energy homeostasis and inflammation. *J. Neuroinflammation*, **14**, 91.
- Dyall, S.C. (2015) Long-chain omega-3 fatty acids and the brain : a review of the independent and shared effects of EPA, DPA and DHA. *Front. Aging Neurosci.*, **7**, 52.
- Elinder, F. & Liin, S.I. (2017) Actions and Mechanisms of Polyunsaturated Fatty Acids on Voltage-Gated Ion Channels. *Front. Physiol.*, **8**.
- Enslin, M., Milon, H., & Malnoë, A. (1991) Effect of low intake of n-3 fatty acids during development on brain phospholipid fatty acid composition and exploratory behavior in rats. *Lipids*, **26**, 203–208.

- Fahy, E., Subramaniam, S., Brown, H.A., Glass, C.K., Merrill, A.H., Murphy, R.C., Raetz, C.R.H., Russell, D.W., Seyama, Y., Shaw, W., Shimizu, T., Spener, F., van Meer, G., VanNieuwenhze, M.S., White, S.H., Witztum, J.L., & Dennis, E.A. (2005) A comprehensive classification system for lipids. *J. Lipid Res.*, **46**, 839–861.
- Falomir-Lockhart, L.J., Cavazzutti, G.F., Giménez, E., & Toscani, A.M. (2019) Fatty acid signaling mechanisms in neural cells : fatty acid receptors. *Front. Cell. Neurosci.*, **13**, 162.
- Farkas, T., Kitajka, K., Fodor, E., Csengeri, I., Lahdes, E., Yeo, Y.K., Krasznai, Z., & Halver, J.E. (2000) Docosahexaenoic acid-containing phospholipid molecular species in brains of vertebrates. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **97**, 6362–6366.
- Farooqui, A.A. & Horrocks, L.A. (2001) Plasmalogens, phospholipase A2, and docosahexaenoic acid turnover in brain tissue. *J. Mol. Neurosci.*, **16**, 263–284.
- Fedorova, I. & Salem, N. (2006) Omega-3 fatty acids and rodent behavior. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids*, **75**, 271–289.
- Firestein, S. (2001) How the olfactory system makes sense of scents. *Nature*, **413**, 211–218.
- Fleischer, J., Breer, H., & Strotmann, J. (2009) Mammalian olfactory receptors. *Front. Cell. Neurosci.*, **3**, 9.
- Frederick, D.E., Rojas-Líbano, D., Scott, M., & Kay, L.M. (2011) Rat behavior in go/no-go and two-alternative choice odor discrimination : differences and similarities. *Behav. Neurosci.*, **125**, 588–603.
- Genovese, F. & Tizzano, M. (2018) Microvillous cells in the olfactory epithelium express elements of the solitary chemosensory cell transduction signaling cascade. *PLoS ONE*, **13**, e0202754.
- Gibson, R.A., Muhlhausler, B., & Makrides, M. (2011) Conversion of linoleic acid and alpha-linolenic acid to long-chain polyunsaturated fatty acids (LCPUFAs), with a focus on pregnancy, lactation and the first 2 years of life. *Matern Child Nutr*, **7 Suppl 2**, 17–26.
- Glezer, I. & Malnic, B. (2019) Olfactory receptor function. *Handb Clin Neurol*, **164**, 67–78.
- Gómez Candela, C., Bermejo López, L.M., & Loria Kohen, V. (2011) Importance of a balanced omega 6/omega 3 ratio for the maintenance of health : nutritional recommendations. *Nutr Hosp*, **26**, 323–329.
- Göttlicher, M., Demoz, A., Svensson, D., Tollet, P., Berge, R.K., & Gustafsson, J.A. (1993) Structural and metabolic requirements for activators of the peroxisome proliferator-activated receptor. *Biochem. Pharmacol.*, **46**, 2177–2184.

- Gould, J.F., Makrides, M., Colombo, J., & Smithers, L.G. (2014) Randomized controlled trial of maternal omega-3 long-chain PUFA supplementation during pregnancy and early childhood development of attention, working memory, and inhibitory control. *Am. J. Clin. Nutr.*, **99**, 851–859.
- Grabe, V. & Sachse, S. (2018) Fundamental principles of the olfactory code. *Biosystems*, **164**, 94–101.
- Green, P., Glozman, S., Kamensky, B., & Yavin, E. (1999) Developmental changes in rat brain membrane lipids and fatty acids. The preferential prenatal accumulation of docosahexaenoic acid. *J. Lipid Res.*, **40**, 960–966.
- Greiner, R.S., Moriguchi, T., Slotnick, B.M., Hutton, A., & Salem, N. (2001) Olfactory discrimination deficits in n-3 fatty acid-deficient rats. *Physiol Behav*, **72**, 379–385.
- Griff, E.R., Greer, C.A., Margolis, F., Ennis, M., & Shipley, M.T. (2000) Ultrastructural characteristics and conduction velocity of olfactory receptor neuron axons in the olfactory marker protein-null mouse. *Brain Res*, **866**, 227–236.
- Guesnet, P., Alessandri, J.-M., Astorg, P., Pifferi, F., & Lavialle, M. (2005) Les rôles physiologiques majeurs exercés par les acides gras polyinsaturés (AGPI). *Ol. corps gras lipides*, **12**, 333–343.
- Guesnet, P., Marmonier, C., Boyer, C., & Delplanque, B. (2018) Impact of maternal dietary lipids on human health. *Ol. corps gras lipides*, **25**, D302.
- Guilloux, J.-P., 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.
- Ha, T.S., Xia, R., Zhang, H., Jin, X., & Smith, D.P. (2014) Lipid flippase modulates olfactory receptor expression and odorant sensitivity in *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **111**, 7831–7836.
- Hancock, J.F. (2006) Lipid rafts: contentious only from simplistic standpoints. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **7**, 456–462.
- Hashimoto, M., Hossain, S., Al Mamun, A., Matsuzaki, K., & Arai, H. (2017) Docosahexaenoic acid: one molecule diverse functions. *Crit. Rev. in Biotechnol.*, **37**, 579–597.
- Hashimoto, M., Hossain, S., Shimada, T., & Shido, O. (2006) Docosahexaenoic acid-induced protective effect against impaired learning in amyloid beta-infused rats is associated with increased synaptosomal membrane fluidity. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*, **33**, 934–939.

- 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. *Eur. J. Neurosci.*, **32**, 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. *Front. Behav. Neurosci.*, **5**, 25.
- Heydel, J.-M., Coelho, A., Thiebaud, N., Legendre, A., Le Bon, A.-M., Faure, P., Neiers, F., Artur, Y., Golebiowski, J., & Briand, L. (2013) Odorant-binding proteins and xenobiotic metabolizing enzymes: implications in olfactory perireceptor events. *Anat. Rec. (Hoboken)*, **296**, 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. Metab. Rev.*, **42**, 74–97.
- 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. *Behav Brain Res*, **184**, 1–10.
- Hooper, C., De Souto Barreto, P., Pahor, M., Weiner, M., & Vellas, B. (2018) The relationship of omega 3 polyunsaturated fatty acids in red blood cell membranes with cognitive function and brain structure: a review focussed on Alzheimer’s disease. *J. Prev. Alzheimer’s Dis.*, **5**, 78–84.
- Hoppe-Seyler’s Zeitschrift für Physiologische Chemie (1977) IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature.
- Ibarra-Soria, X., Levitin, M.O., Saraiva, L.R., & Logan, D.W. (2014) The olfactory transcriptomes of mice. *PLoS Genet.*, **10**, e1004593.
- Ikegami, K., de March, C.A., Nagai, M.H., Ghosh, S., Do, M., Sharma, R., Bruguera, E.S., Lu, Y.E., Fukutani, Y., Vaidehi, N., Yohda, M., & Matsunami, H. (2019) Structural instability and divergence from conserved residues underlie intracellular retention of mammalian odorant receptors (preprint). *Cell Biology*.
- Imai, T. (2014) Construction of functional neuronal circuitry in the olfactory bulb. *Semin. Cell Dev. Biol.*, **35**, 180–188.
- Imai, T. & Sakano, H. (2008) Odorant receptor-mediated signaling in the mouse. *Curr. Opin. Neurobiol.*, **18**, 251–260.

- Ingólfsson, H.I., Carpenter, T.S., Bhatia, H., Bremer, P.-T., Marrink, S.J., & Lightstone, F.C. (2017) Computational Lipidomics of the Neuronal Plasma Membrane. *Biophys J*, **113**, 2271–2280.
- Innis, S.M. (2003) Perinatal biochemistry and physiology of long-chain polyunsaturated fatty acids. *J. Pediatr.*, **143**, S1-8.
- Innis, S.M. (2008) Dietary omega 3 fatty acids and the developing brain. *Brain Res.*, **1237**, 35–43.
- Joffre, C. (2019) Polyunsaturated fatty acid metabolism in the brain and brain cells. In Bosch-Bouju, C., Layé, S., & Pallet, V. (eds), *Feed Your Mind - How Does Nutrition Modulate Brain Function throughout Life?* IntechOpen.
- Joffre, C., Rey, C., & Layé, S. (2019) N-3 Polyunsaturated Fatty Acids and the Resolution of Neuroinflammation. *Front Pharmacol*, **10**, 1022.
- Julliard, A.-K., Al Koborssy, D., Fadool, D.A., & Palouzier-Paulignan, B. (2017) Nutrient sensing : another chemosensitivity of the olfactory system. *Front. Physiol.*, **8**, 468.
- Kaiser, F., Huebecker, M., & Wachten, D. (2020) Sphingolipids controlling ciliary and microvillar function. *FEBS Lett.*, **594**, 3652–3667.
- Kalmijn, S., Launer, L.J., Ott, A., Witteman, J.C., Hofman, A., & Breteler, M.M. (1997) Dietary fat intake and the risk of incident dementia in the Rotterdam Study. *Ann. Neurol.*, **42**, 776–782.
- Kanageswaran, N., Demond, M., Nagel, M., Schreiner, B.S.P., Baumgart, S., Scholz, P., Altmüller, J., Becker, C., Doerner, J.F., Conrad, H., Oberland, S., Wetzel, C.H., Neuhaus, E.M., Hatt, H., & Gisselmann, G. (2015) Deep sequencing of the murine olfactory receptor neuron transcriptome. *PLoS One*, **10**, e0113170.
- Kass, M.D., Moberly, A.H., & McGann, J.P. (2013) Spatiotemporal alterations in primary odorant representations in olfactory marker protein knockout mice. *PLoS ONE*, **8**, e61431.
- Katada, S., Hirokawa, T., Oka, Y., Suwa, M., & Touhara, K. (2005) Structural basis for a broad but selective ligand spectrum of a mouse olfactory receptor: mapping the odorant-binding site. *J. Neurosci.*, **25**, 1806–1815.
- Kato, A. & Touhara, K. (2009) Mammalian olfactory receptors: pharmacology, G protein coupling and desensitization. *Cell. Mol. Life Sci.*, **66**, 3743–3753.
- Kaupp, U.B. (2010) Olfactory signalling in vertebrates and insects: differences and commonalities. *Nat. Rev. Neurosci.*, **11**, 188–200.

- Kavanagh, T., Lonergan, P.E., & Lynch, M.A. (2004) Eicosapentaenoic acid and gamma-linolenic acid increase hippocampal concentrations of IL-4 and IL-10 and abrogate lipopolysaccharide-induced inhibition of long-term potentiation. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids*, **70**, 391–397.
- Kawakita, E., Hashimoto, M., & Shido, O. (2006) Docosahexaenoic acid promotes neurogenesis in vitro and in vivo. *Neuroscience*, **139**, 991–997.
- Khoury, S., Soubeyre, V., Cabaret, S., Merle, L., Grégoire, S., Deprêtre, N., Jarriault, D., Gros-maitre, X., Bretillon, L., Berdeaux, O., Acar, N., & Le Bon, A.M. (2020) Perinatal exposure to diets with different n-6:n-3 fatty acid ratios affects olfactory tissue fatty acid composition. *Sci Rep*, **10**, 10785.
- Kim, H.-Y., Spector, A.A., & Xiong, Z.-M. (2011) A synaptogenic amide N-docosahexaenoylethanolamide promotes hippocampal development. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.*, **96**, 114–120.
- Kirkham, B.W., Lassere, M.N., Edmonds, J.P., Juhasz, K.M., Bird, P.A., Lee, C.S., Shnier, R., & Portek, I.J. (2006) Synovial membrane cytokine expression is predictive of joint damage progression in rheumatoid arthritis: a two-year prospective study (the DAMAGE study cohort). *Arthritis Rheum.*, **54**, 1122–1131.
- Kitajka, K., Sinclair, A.J., Weisinger, R.S., Weisinger, H.S., Mathai, M., Jayasooriya, A.P., Halver, J.E., & Puskás, L.G. (2004) Effects of dietary omega-3 polyunsaturated fatty acids on brain gene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **101**, 10931–10936.
- Kleene, S.J. (2008) The electrochemical basis of odor transduction in vertebrate olfactory cilia. *Chem Senses*, **33**, 839–859.
- Kleene, S.J. & Gesteland, R.C. (1981) Dissociation of frog olfactory epithelium with N-ethylmaleimide. *Brain Res.*, **229**, 536–540.
- Kobayakawa, K., Kobayakawa, R., Matsumoto, H., Oka, Y., Imai, T., Ikawa, M., Okabe, M., Ikeda, T., Itohara, S., Kikusui, T., Mori, K., & Sakano, H. (2007) Innate versus learned odour processing in the mouse olfactory bulb. *Nature*, **450**, 503–508.
- Kodas, E., Galineau, L., Bodard, S., Vancassel, S., Guilloteau, D., Besnard, J.-C., & Chalon, S. (2004) Serotonergic neurotransmission is affected by n-3 polyunsaturated fatty acids in the rat. *J. Neurochem.*, **89**, 695–702.
- Koyama, N. & Kurihara, K. (1972) Effect of odorants on lipid monolayers from bovine olfactory epithelium. *Nature*, **236**, 402–404.

- Kraft, M.L. (2016) Sphingolipid Organization in the Plasma Membrane and the Mechanisms That Influence It. *Front. Cell Dev. Biol.*, **4**, 154.
- Kurahashi, T. (1989) Activation by odorants of cation-selective conductance in the olfactory receptor cell isolated from the newt. *J. Physiol.*, **419**, 177–192.
- Kwon, H.J., Koo, J.H., Zufall, F., Leinders-Zufall, T., & Margolis, F.L. (2009) Ca extrusion by NCX is compromised in olfactory sensory neurons of OMP mice. *PLoS One*, **4**, e4260.
- Lacombe, R.J.S., Chouinard-Watkins, R., & Bazinet, R.P. (2018) Brain docosahexaenoic acid uptake and metabolism. *Mol. Aspects Med.*, **64**, 109–134.
- Lafourcade, M., Larrieu, T., Mato, S., Duffaud, A., Sepers, M., Matias, I., De Smedt-Peyrusse, V., Labrousse, V.F., Bretillon, L., Matute, C., Rodríguez-Puertas, R., Layé, S., & Manzoni, O.J. (2011) Nutritional omega-3 deficiency abolishes endocannabinoid-mediated neuronal functions. *Nat. Neurosci.*, **14**, 345–350.
- Larrieu, T. & Layé, S. (2018) Food for mood : relevance of nutritional omega-3 fatty acids for depression and anxiety. *Front. Physiol.*, **9**, 1047.
- Le Bon, A.M., Deprêtre, N., Sibille, E., Cabaret, S., Grégoire, S., Soubeyre, V., Masson, E., Acar, N., Bretillon, L., Grosmaître, X., & Berdeaux, O. (2018) Comprehensive study of rodent olfactory tissue lipid composition. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, **131**, 32–43.
- Ledoux, M. (2012) Principaux constituants des lipides. Structure, classification, et nomenclature chimique.
- Lee, A.C., He, J., & Ma, M. (2011) Olfactory marker protein is critical for functional maturation of olfactory sensory neurons and development of mother preference. *J Neurosci*, **31**, 2974–2982.
- Lepousez, G. & Gheusi, G. (2011) Olfaction : the cortex reshuffles the maps. *Med Sci (Paris)*, **27**, 687–689.
- Li, P., Banjade, S., Cheng, H.-C., Kim, S., Chen, B., Guo, L., Llaguno, M., Hollingsworth, J.V., King, D.S., Banani, S.F., Russo, P.S., Jiang, Q.-X., Nixon, B.T., & Rosen, M.K. (2012) Phase transitions in the assembly of multivalent signalling proteins. *Nature*, **483**, 336–340.
- Lingwood, D. & Simons, K. (2010) Lipid rafts as a membrane-organizing principle. *Science*, **327**, 46–50.

- Liu, Y.-C., Pearce, M.W., Honda, T., Johnson, T.K., Charlu, S., Sharma, K.R., Imad, M., Burke, R.E., Zinsmaier, K.E., Ray, A., Dahanukar, A., de Bruyne, M., & Warr, C.G. (2014) The *Drosophila melanogaster* phospholipid flippase dATP8B is required for odorant receptor function. *PLoS Genet.*, **10**, e1004209.
- Lobasso, S., Lopalco, P., Angelini, R., Baronio, M., Fanizzi, F.P., Babudri, F., & Corcelli, A. (2010) Lipidomic analysis of porcine olfactory epithelial membranes and cilia. *Lipids*, **45**, 593–602.
- Lodovichi, C. (2021) Topographic organization in the olfactory bulb. *Cell Tissue Res.*, **383**, 457–472.
- Lohner, S., Fekete, K., Marosvölgyi, T., & Decsi, T. (2013) Gender differences in the long-chain polyunsaturated fatty acid status : systematic review of 51 publications. *Ann. Nutr. Metab.*, **62**, 98–112.
- Lonergan, P.E., Martin, D.S.D., Horrobin, D.F., & Lynch, M.A. (2004) Neuroprotective actions of eicosapentaenoic acid on lipopolysaccharide-induced dysfunction in rat hippocampus. *J. Neurochem.*, **91**, 20–29.
- Lozada, L.E., Desai, A., Kevala, K., Lee, J.-W., & Kim, H.-Y. (2017) Perinatal brain docosahexaenoic acid concentration has a lasting impact on cognition in mice. *J. Nutr.*, **147**, 1624–1630.
- Ma, M. & Shepherd, G.M. (2000) Functional mosaic organization of mouse olfactory receptor neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **97**, 12869–12874.
- Mackay-Sim, A. & Kittel, P. (1991) Cell dynamics in the adult mouse olfactory epithelium : a quantitative autoradiographic study. *J. Neurosci.*, **11**, 979–984.
- Madore, C., Leyrolle, Q., Morel, L., Rossitto, M., Greenhalgh, A.D., Delpech, J.C., Martinat, M., Bosch-Bouju, C., Bourel, J., Rani, B., Lacabanne, C., Thomazeau, A., Hopperton, K.E., Becchari, S., Sere, A., Aubert, A., De Smedt-Peyrusse, V., Lecours, C., Bisht, K., Fourgeaud, L., Gregoire, S., Bretillon, L., Acar, N., Grant, N.J., Badaut, J., Gressens, P., Sierra, A., Butovsky, O., Tremblay, M.E., Bazinet, R.P., Joffre, C., Nadjar, A., & Layé, S. (2020) Essential omega-3 fatty acids tune microglial phagocytosis of synaptic elements in the mouse developing brain. *Nat Commun*, **11**, 6133.
- Madore, C., Nadjar, A., Delpech, J.-C., Sere, A., Aubert, A., Portal, C., Joffre, C., & Layé, S. (2014) Nutritional n-3 PUFAs deficiency during perinatal periods alters brain innate immune system and neuronal plasticity-associated genes. *Brain Behav. Immun.*, **41**, 22–31.

- Mainland, J. & Matsunami, H. (2012) RAMP like proteins : RTP and REEP family of proteins. *Adv. Exp. Med. Biol.*, **744**, 75–86.
- Malhotra, R. (2012) Membrane Glycolipids: Functional Heterogeneity: A Review. *Biochem Anal. Biochem.*, **1**.
- Malnic, B., Hirono, J., Sato, T., & Buck, L.B. (1999) Combinatorial receptor codes for odors. *Cell*, **96**, 713–723.
- Mandairon, N., Sultan, S., Rey, N., Kermen, F., Moreno, M., Busto, G., Farget, V., Messaoudi, B., Thevenet, M., & Didier, A. (2009) A computer-assisted odorized hole-board for testing olfactory perception in mice. *J. Neurosci. Methods*, **180**, 296–303.
- Marangoni, F., Cetin, I., Verduci, E., Canzone, G., Giovannini, M., Scollo, P., Corsello, G., & Poli, A. (2016) Maternal diet and nutrient requirements in pregnancy and breastfeeding. An Italian consensus document. *Nutrients*, **8**, E629.
- Martin, C., Passilly-Degrace, P., Gaillard, D., Merlin, J.-F., Chevrot, M., & Besnard, P. (2011) The lipid-sensor candidates CD36 and GPR120 are differentially regulated by dietary lipids in Mouse taste buds : impact on spontaneous fat preference. *PLoS ONE*, **6**, e24014.
- Martinat, M., Rossitto, M., Di Miceli, M., & Layé, S. (2021) Perinatal dietary polyunsaturated fatty acids in brain development, role in neurodevelopmental disorders. *Nutrients*, **13**, 1185.
- Mas, E., Croft, K.D., Zahra, P., Barden, A., & Mori, T.A. (2012) Resolvins D1, D2, and other mediators of self-limited resolution of inflammation in human blood following n-3 fatty acid supplementation. *Clin. Chem.*, **58**, 1476–1484.
- Mathieu, G., Géraldine, M., Denis, S., Stéphanie, D., Langelier, B., Bénédicte, L., Denis, I., Isabelle, D., Laviaille, M., Monique, L., Vancassel, S., & Sylvie, V. (2010) DHA enhances the norepinephrine release by SH-SY5Y cells. *Neurochem. Int.*, **56**, 94–100.
- Mencarelli, C. & Martinez-Martinez, P. (2013) Ceramide function in the brain: when a slight tilt is enough. *Cell. Mol. Life Sci.*, **70**, 181–203.
- Menco, B.P.M. (2005) The fine-structural distribution of G-protein receptor kinase 3, beta-arrestin-2, Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II and phosphodiesterase PDE1C2, and a Cl⁻-cotransporter in rodent olfactory epithelia. *J. Neurocytol.*, **34**, 11–36.
- Menini, A. (2010) *The Neurobiology of Olfaction*, Frontiers in Neuroscience. CRC Press/Taylor & Francis, Boca Raton (FL).

- Merle, L. (2018) 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.
- Merle, L., Person, O., Bonnet, P., Grégoire, S., Soubeyre, V., Grosmaître, X., & Jarriault, D. (2019) Maternal high fat high sugar diet disrupts olfactory behavior but not mucosa sensitivity in the offspring. *Psychoneuroendocrinology*, **104**, 249–258.
- Mombaerts, P. (1996) Targeting olfaction. *Curr. Opin. Neurobiol.*, **6**, 481–486.
- Montigny, C., Lyons, J., Champeil, P., Nissen, P., & Lenoir, G. (2016) On the molecular mechanism of flippase- and scramblase-mediated phospholipid transport. *Biochim. Biophys. Acta*, **1861**, 767–783.
- Mori, K. (2014) *The Olfactory System: From Odor Molecules to Motivational Behaviors*. Springer, Tokyo ; New York.
- Mori, K., Takahashi, Y.K., Igarashi, K.M., & Yamaguchi, M. (2006) Maps of odorant molecular features in the Mammalian olfactory bulb. *Physiol. Rev.*, **86**, 409–433.
- Moriguchi, T., Greiner, R.S., & Salem, N. (2000) Behavioral deficits associated with dietary induction of decreased brain docosahexaenoic acid concentration. *J. Neurochem.*, **75**, 2563–2573.
- Moriguchi, T. & Salem, N. (2003) Recovery of brain docosahexaenoate leads to recovery of spatial task performance. *J. Neurochem.*, **87**, 297–309.
- Morris, M.C., Evans, D.A., Bienias, J.L., Tangney, C.C., Bennett, D.A., Wilson, R.S., Aggarwal, N., & Schneider, J. (2003) Consumption of fish and n-3 fatty acids and risk of incident Alzheimer disease. *Arch. Neurol.*, **60**, 940–946.
- Morrison, E.E. & Costanzo, R.M. (1990) Morphology of the human olfactory epithelium. *J. Comp. Neurol.*, **297**, 1–13.
- Mouritsen, O. (2005) Life — As a Matter of Fat. In *The Frontiers Collection*. Springer, Berlin, Heidelberg.
- Mouritsen, O.G. & Zuckermann, M.J. (2004) What's so special about cholesterol? *Lipids*, **39**, 1101–1113.
- Mulder, K.A., King, D.J., & Innis, S.M. (2014) Omega-3 fatty acid deficiency in infants before birth identified using a randomized trial of maternal DHA supplementation in pregnancy. *PLoS ONE*, **9**, e83764.

- Müller, C.P., Reichel, M., Mühle, C., Rhein, C., Gulbins, E., & Kornhuber, J. (2015) Brain membrane lipids in major depression and anxiety disorders. *Biochim. Biophys. Acta*, **1851**, 1052–1065.
- Nagayama, S., Homma, R., & Imamura, F. (2014) Neuronal organization of olfactory bulb circuits. *Front. Neural Circuits*, **8**, 98.
- Nakashima, N., Nakashima, K., Nakashima, A., & Takano, M. (2020) Olfactory marker protein captures cAMP produced via G α s-protein-coupled receptor activation. *Biochem Biophys Res Commun*, **529**, 341–346.
- Nakashima, Y., Yuasa, S., Hukamizu, Y., Okuyama, H., Ohhara, T., Kameyama, T., & Nabeshima, T. (1993) Effect of a high linoleate and a high alpha-linolenate diet on general behavior and drug sensitivity in mice. *J. Lipid Res.*, **34**, 239–247.
- Nechipurenko, I.V. (2020) The Enigmatic Role of Lipids in Cilia Signaling. *Front. Cell Dev. Biol.*, **8**, 777.
- Nickell, M.D., Breheny, P., Stromberg, A.J., & McClintock, T.S. (2012) Genomics of mature and immature olfactory sensory neurons. *J. Comp. Neurol.*, **520**, 2608–2629.
- Nishizumi, H. & Sakano, H. (2020) Circuit formation and synaptic plasticity in the mouse olfactory system. In *The Senses : A Comprehensive Reference*, 2nd edition. edn. pp. 545–564.
- Niu, S.-L., Mitchell, D.C., Lim, S.-Y., Wen, Z.-M., Kim, H.-Y., Salem, N., & Litman, B.J. (2004) Reduced G protein-coupled signaling efficiency in retinal rod outer segments in response to n-3 fatty acid deficiency. *J. Biol. Chem.*, **279**, 31098–31104.
- Oberland, S., Ackels, T., Gaab, S., Pelz, T., Spehr, J., Spehr, M., & Neuhaus, E.M. (2015) CD36 is involved in oleic acid detection by the murine olfactory system. *Front. Cell. Neurosci.*, **9**, 366.
- Obrebowski, A., Obrebowska-Karsznia, Z., & Gawliński, M. (2000) Smell and taste in children with simple obesity. *Int. J. Pediatr. Otorhinolaryngol.*, **55**, 191–196.
- Palouzier-Paulignan, B., Lacroix, M.-C., Aimé, 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.
- Petrache, H.I., Harries, D., & Parsegian, V.A. (2005) Alteration of lipid membrane rigidity by cholesterol and its metabolic precursors. *Macromol. Symp.*,.
- Pfaffl, M.W. (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.*, **29**, e45.

- Pifferi, S., Menini, A., & Kurahashi, T. (2010) Signal Transduction in Vertebrate Olfactory Cilia. In Menini, A. (ed), *The Neurobiology of Olfaction, Frontiers in Neuroscience*. CRC Press/Taylor & Francis, Boca Raton (FL).
- Pomeroy, S.L., LaMantia, A.S., & Purves, D. (1990) Postnatal construction of neural circuitry in the mouse olfactory bulb. *J. Neurosci.*, **10**, 1952–1966.
- Poveda, J.A., Giudici, A.M., Renart, M.L., Molina, M.L., Montoya, E., Fernández-Carvajal, A., Fernández-Ballester, G., Encinar, J.A., & González-Ros, J.M. (2014) Lipid modulation of ion channels through specific binding sites. *Biochim. Biophys. Acta*, **1838**, 1560–1567.
- 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.
- Ramón-Cueto, A. & Avila, J. (1998) Olfactory ensheathing glia: properties and function. *Brain Res. Bull.*, **46**, 175–187.
- Rando, O.J. & Simmons, R.A. (2015) I'm eating for two: parental dietary effects on offspring metabolism. *Cell*, **161**, 93–105.
- Reeves, P.G., Nielsen, F.H., & Fahey, G.C. (1993) AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *J. Nutr.*, **123**, 1939–1951.
- Reisert, J. & Reingruber, J. (2019) Ca²⁺-activated Cl⁻ current ensures robust and reliable signal amplification in vertebrate olfactory receptor neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **116**, 1053–1058.
- Reisert, J., Yau, K.-W., & Margolis, F.L. (2007) Olfactory marker protein modulates the cAMP kinetics of the odour-induced response in cilia of mouse olfactory receptor neurons. *J Physiol*, **585**, 731–740.
- Rey, C., Delpech, J.C., Madore, C., Nadjar, A., Greenhalgh, A.D., Amadiou, C., Aubert, A., Pallet, V., Vaysse, C., Layé, S., & Joffre, C. (2019) Dietary n-3 long chain PUFA supplementation promotes a pro-resolving oxylipin profile in the brain. *Brain Behav. Immun.*, **76**, 17–27.
- Richardson, B.E., Vander Woude, E.A., Sudan, R., Thompson, J.S., & Leopold, D.A. (2004) Altered olfactory acuity in the morbidly obese. *Obes. Surg.*, **14**, 967–969.
- Rivière, S., Soubeyre, V., Jarriault, D., Molinas, A., Léger-Charnay, E., Desmoulins, L., Grebert, D., Meunier, N., & Grosmaître, X. (2016) High Fructose Diet inducing diabetes rapidly impacts olfactory epithelium and behavior in mice. *Sci. Rep.*, **6**, 34011.

- Rodriguez, I. (2004) Pheromone receptors in mammals. *Horm Behav*, **46**, 219–230.
- Rodriguez-Gil, D.J., Bartel, D.L., Jaspers, A.W., Mobley, A.S., Imamura, F., & Greer, C.A. (2015) Odorant receptors regulate the final glomerular coalescence of olfactory sensory neuron axons. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **112**, 5821–5826.
- 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.
- Russell, Y., Evans, P., & Dodd, G.H. (1989) Characterization of the total lipid and fatty acid composition of rat olfactory mucosa. *J. Lipid Res.*, **30**, 877–884.
- Salvati, S., Natali, F., Attorri, L., Di Benedetto, R., Leonardi, F., Di Biase, A., Ferri, F., Fortuna, S., Lorenzini, P., Sanchez, M., Ricceri, L., & Vitelli, L. (2008) Eicosapentaenoic acid stimulates the expression of myelin proteins in rat brain. *J. Neurosci. Res.*, **86**, 776–784.
- Sampath, H. & Ntambi, J.M. (2004) Polyunsaturated fatty acid regulation of gene expression. *Nutr. Rev.*, **62**, 333–339.
- Sastry, P.S. (1985) Lipids of nervous tissue: composition and metabolism. *Prog. Lipid Res.*, **24**, 69–176.
- Schild, D. & Restrepo, D. (1998) Transduction mechanisms in vertebrate olfactory receptor cells. *Physiol. Rev.*, **78**, 429–466.
- Schwob, J.E. (2005) Restoring olfaction: a view from the olfactory epithelium. *Chem. Senses*, **30 Suppl 1**, i131-132.
- Schwob, J.E., Jang, W., Holbrook, E.H., Lin, B., Herrick, D.B., Peterson, J.N., & Hewitt Coleman, J. (2017) Stem and progenitor cells of the mammalian olfactory epithelium: Taking poetic license. *J Comp Neurol*, **525**, 1034–1054.
- Schwob, J.E., Youngentob, S.L., & Mezza, R.C. (1995) Reconstitution of the rat olfactory epithelium after methyl bromide-induced lesion. *J. Comp. Neurol.*, **359**, 15–37.
- Scott, J.W. & Scott-Johnson, P.E. (2002) The electroolfactogram : a review of its history and uses. *Microsc. Res. Tech.*, **58**, 152.
- Seebungkert, B. & Lynch, J.W. (2002) Effects of polyunsaturated fatty acids on voltage-gated K⁺ and Na⁺ channels in rat olfactory receptor neurons: PUFA modulation of olfactory ion channels. *Eur. J. Neurosci.*, **16**, 2085–2094.
- Serhan, C.N., Dalli, J., Colas, R.A., Winkler, J.W., & Chiang, N. (2015) Protectins and maresins : new pro-resolving families of mediators in acute inflammation and resolution bioactive metabolome. *Biochim. Biophys. Acta*, **1851**, 397–413.

- Sezgin, E., Levental, I., Mayor, S., & Eggeling, C. (2017) The mystery of membrane organization : composition, regulation and roles of lipid rafts. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.*, **18**, 361–374.
- Shaikh, S.R., Dumaul, A.C., Jenki, L.J., & Stillwell, W. (2001) Lipid phase separation in phospholipid bilayers and monolayers modeling the plasma membrane. *Biochim. Biophys. Acta*, **1512**, 317–328.
- Sharma, R., Ishimaru, Y., Davison, I., Ikegami, K., Chien, M.-S., You, H., Chi, Q., Kubota, M., Yohda, M., Ehlers, M., & Matsunami, H. (2017) Olfactory receptor accessory proteins play crucial roles in receptor function and gene choice. *Elife*, **6**, e21895.
- Sharom, F.J. (2011) Flipping and flopping--lipids on the move. *IUBMB Life*, **63**, 736–746.
- Shi, Z., Ren, H., Huang, Z., Peng, Y., He, B., Yao, X., Yuan, T.-F., & Su, H. (2017) Fish oil prevents lipopolysaccharide-induced depressive-like behavior by inhibiting neuroinflammation. *Mol. Neurobiol.*, **54**, 7327–7334.
- Sierra, S., Lara-Villoslada, F., Comalada, M., Olivares, M., & Xaus, J. (2008) Dietary eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid equally incorporate as decosahexaenoic acid but differ in inflammatory effects. *Nutrition*, **24**, 245–254.
- Simons, K. & Sampaio, J.L. (2011) Membrane organization and lipid rafts. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, **3**, a004697.
- Simopoulos, A.P. (2002) The importance of the ratio of omega-6/omega-3 essential fatty acids. *Biomed Pharmacother*, **56**, 365–379.
- Simopoulos, A.P. (2010) The omega-6/omega-3 fatty acid ratio: health implications. *Ol. corps gras lipides*, **17**, 267–275.
- Slotte, J.P. (2013) Biological functions of sphingomyelins. *Prog. Lipid Res.*, **52**, 424–437.
- Song, C., Manku, M.S., & Horrobin, D.F. (2008) Long-chain polyunsaturated fatty acids modulate interleukin-1beta-induced changes in behavior, monoaminergic neurotransmitters, and brain inflammation in rats. *J. Nutr.*, **138**, 954–963.
- St. John, J.A. & Key, B. (2005) Olfactory marker protein modulates primary olfactory axon overshooting in the olfactory bulb. *J. Comp. Neurol.*, **488**, 61–69.
- Stephan, A.B., Tobochnik, S., Dibattista, M., Wall, C.M., Reisert, J., & Zhao, H. (2011) The Na(+)/Ca(2+) exchanger NCKX4 governs termination and adaptation of the mammalian olfactory response. *Nat. Neurosci.*, **15**, 131–137.
- Strotmann, J. & Breer, H. (2011) Internalization of odorant-binding proteins into the mouse olfactory epithelium. *Histochem. Cell. Biol.*, **136**, 357–369.

- Stuchlik, A. (2014) Dynamic learning and memory, synaptic plasticity and neurogenesis: an update. *Front. Behav. Neurosci.*, **8**, 106.
- Subczynski, W.K., Pasenkiewicz-Gierula, M., Widomska, J., Mainali, L., & Raguz, M. (2017) High cholesterol/low cholesterol : effects in biological membranes : a review. *Cell Biochem. Biophys.*, **75**, 369–385.
- Suzuki, J. & Osumi, N. (2015) Neural crest and placode contributions to olfactory development. *Curr. Top. Dev. Biol.*, **111**, 351–374.
- Svennerholm, L. (1968) Distribution and fatty acid composition of phosphoglycerides in normal human brain. *J. Lipid Res.*, **9**, 570–579.
- Takeda, M., Sawano, S., Imaizumi, M., & Fushiki, T. (2001) Preference for corn oil in olfactory-blocked mice in the conditioned place preference test and the two-bottle choice test. *Life Sci.*, **69**, 847–854.
- Takeuchi, H., Inokuchi, K., Aoki, M., Suto, F., Tsuboi, A., Matsuda, I., Suzuki, M., Aiba, A., Serizawa, S., Yoshihara, Y., Fujisawa, H., & Sakano, H. (2010) Sequential arrival and graded secretion of sema3F by olfactory neuron axons specify map topography at the bulb. *Cell*, **141**, 1056–1067.
- Tang, M., Zhang, M., Cai, H., Li, H., Jiang, P., Dang, R., Liu, Y., He, X., Xue, Y., Cao, L., & Wu, Y. (2016) Maternal diet of polyunsaturated fatty acid altered the cell proliferation in the dentate gyrus of hippocampus and influenced glutamatergic and serotonergic systems of neonatal female rats. *Lipids Health Dis.*, **15**, 71.
- The Good Scents Company [WWW Document] (n.d.) . URL <http://www.thegoodscentscompany.com/>
- 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**, 6970–6984.
- Treolar, H., Miller, A., Ray, A., & Greer, C. (2010) Development of the Olfactory System. I. In *The Neurobiology of Olfaction*, Menini A, editor. edn. Boca Raton (FL):CRC Press/Taylor & Francis.
- Ukhanov, K., Corey, E., & Ache, B.W. (2016) Phosphoinositide-3-Kinase is the primary mediator of phosphoinositide-dependent inhibition in mammalian olfactory receptor neurons. *Front. Cell. Neurosci.*, **10**, 97.

- Ukhanov, K., Corey, E.A., & Ache, B.W. (2013) Phosphoinositide 3-kinase dependent inhibition as a broad basis for opponent coding in Mammalian olfactory receptor neurons. *PLoS One*, **8**, e61553.
- Wainwright, P.E., Jalali, E., Mutsaers, L.M., Bell, R., & Cvitkovic, S. (1999) An imbalance of dietary essential fatty acids retards behavioral development in mice. *Physiol. Behav.*, **66**, 833–839.
- Wainwright, P.E., Xing, H.C., Mutsaers, L., McCutcheon, D., & Kyle, D. (1997) Arachidonic acid offsets the effects on mouse brain and behavior of a diet with a low (n-6):(n-3) ratio and very high levels of docosahexaenoic acid. *J. Nutr.*, **127**, 184–193.
- Wang, F., Nemes, A., Mendelsohn, M., & Axel, R. (1998) Odorant receptors govern the formation of a precise topographic map. *Cell*, **93**, 47–60.
- Weisinger, H.S., Vingrys, A.J., & Sinclair, A.J. (1996) The effect of docosahexaenoic acid on the electroretinogram of the guinea pig. *Lipids*, **31**, 65–70.
- Wesson, D.W., Donahou, T.N., Johnson, M.O., & Wachowiak, M. (2008) Sniffing behavior of mice during performance in odor-guided tasks. *Chem. Senses*, **33**, 581–596.
- Wheeler, T.G., Benolken, R.M., & Anderson, R.E. (1975) Visual membranes: specificity of fatty acid precursors for the electrical response to illumination. *Science*, **188**, 1312–1314.
- Williams, L., Seki, Y., Vuguin, P.M., & Charron, M.J. (2014) Animal models of in utero exposure to a high fat diet : a review. *Biochim. Biophys. Acta*, **1842**, 507–519.
- Yehuda, S., Rabinovitz, S., & Mostofsky, D.I. (2005) Mixture of essential fatty acids lowers test anxiety. *Nutr Neurosci*, **8**, 265–267.
- Youngentob, S.L. (2005) A method for the rapid automated assessment of olfactory function. *Chem Senses*, **30**, 219–229.
- Youngentob, S.L. & Schwob, J.E. (2006) Odorant identification and quality perception following methyl bromide-induced lesions of the olfactory epithelium. *Behav. Neurosci.*, **120**, 1346–1355.
- Zhainazarov, A.B., Spehr, M., Wetzel, C.H., Hatt, H., & Ache, B.W. (2004) Modulation of the olfactory CNG channel by PtdIns(3,4,5)P3. *J. Membr. Biol.*, **201**, 51–57.
- Zhang, X. & Firestein, S. (2002) The olfactory receptor gene superfamily of the mouse. *Nat. Neurosci.*, **5**, 124–133.

Zimmer, L., Delion-Vancassel, S., Durand, G., Guilloteau, D., Bodard, S., Besnard, J.C., & Chalon, S. (2000) Modification of dopamine neurotransmission in the nucleus accumbens of rats deficient in n-3 polyunsaturated fatty acids. *J. Lipid Res.*, **41**, 32–40.

Zimmer, L., Delpal, S., Guilloteau, D., Aïoun, J., Durand, G., & Chalon, S. (2000) Chronic n-3 polyunsaturated fatty acid deficiency alters dopamine vesicle density in the rat frontal cortex. *Neurosci. Lett.*, **284**, 25–28.

Zou, D.-J., Chesler, A., & Firestein, S. (2009) How the olfactory bulb got its glomeruli: a just so story? *Nat. Rev. Neurosci.*, **10**, 611–618.

Zou, J., Wang, W., Pan, Y.-W., Lu, S., & Xia, Z. (2015) Methods to measure olfactory behavior in mice. *Curr Protoc Toxicol*, **63**, 11.18.1-11.18.21.