



**HAL**  
open science

## **Interactions entre olfaction et prise alimentaire : implication des régulations gliales dans le bulbe olfactif.**

Anne Dufourcq, Patrice Congar, Isabelle Denis

### ► **To cite this version:**

Anne Dufourcq, Patrice Congar, Isabelle Denis. Interactions entre olfaction et prise alimentaire : implication des régulations gliales dans le bulbe olfactif.. [0] 2014, 33 p. hal-02793606

**HAL Id: hal-02793606**

**<https://hal.inrae.fr/hal-02793606v1>**

Submitted on 5 Jun 2020

**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.

**MASTER en SCIENCES et TECHNOLOGIES DU VIVANT et de  
L'ENVIRONNEMENT**

n° d'enregistrement :

**RAPPORT DE STAGE**  
pour obtenir  
**LE DIPLÔME DU MASTER en Sciences et Technologies  
du Vivant et de l'Environnement**  
**Mention « Aliments et Bio-produits »**

présenté et soutenu publiquement

par : **Anne DUFOURCQ**

le : **3 Juillet 2014**

**Interactions entre olfaction et prise alimentaire : implication des  
régulations gliales dans le bulbe olfactif.**

 **NBO** Neurobiologie de l'olfaction

*Travail encadré par* : Isabelle DENIS et Patrice CONGAR

***Jurys de soutenance***

M Nicolas DARCEL  
M Jean-François HUNEAU  
Mme Claire GAUDICHON



## *Avant-propos et remerciements*

*Ce rapport de stage est rédigé lors de mon stage de fin d'études, à l'I.N.R.A. de Jouy en Josas au sein de l'unité de Neurobiologie de l'Olfaction (N.B.O.).*

*Je tiens à remercier Edith Pajot, directrice de l'unité N.B.O., de m'avoir accueillie dans son laboratoire.*

*Je remercie tout particulièrement Isabelle Denis et Patrice Congar, chargés de recherche, qui m'ont encadrée pendant ce stage. Je les remercie pour leur formation, leur patience et leurs précieux conseils.*

*Je remercie chaleureusement Gaëlle Champeil-Potokar, ingénieur de recherche, pour son soutien et ses nombreux bons conseils dans ma formation pratique.*

*Je remercie chaleureusement Virginie Daumas-Meyer, doctorante, pour son soutien, sa gentillesse, son enthousiasme ainsi que pour les « pauses jogging » et les déjeuners du mercredi.*

*Merci à Marie-José Sapa d'avoir contribué à ce que mon stage se passe dans d'aussi bonnes conditions.*

*Merci à toutes les personnes du laboratoire pour un accueil chaleureux, merci pour leur aide, leur bonne humeur et leurs encouragements : Patrice Dahirel, Marielle Levillain, Denise Grebert... et plus particulièrement Catherine Papillon qui m'a appris les techniques d'immunohistochimie (et pour les promenades du midi !).*

*Merci à tous !*



## ABBREVIATIONS

<b>BO</b>	Bulbe Olfactif
<b>BSA</b>	Albumine du Sérum Bovin
<b>DAB</b>	Diaminobenzidine
<b>DOPA</b>	Dihydroxyphénylalanine
<b>DTT</b>	Dithiothreitol
<b>GABA</b>	Acide Gamma Amino Butyrique
<b>GFAP</b>	Glial Fibrillar Acidic Protein
<b>GLAST</b>	Glutamate-Aspartate Transporter
<b>GLT-1</b>	Glutamate Transporter 1
<b>GS</b>	Glutamine Synthase
<b>IHC</b>	Immunohistochimie
<b>HRP</b>	Horse Radish Peroxidase
<b>MO</b>	Muqueuse Olfactive
<b>NPY</b>	Neuropeptide Y
<b>NPY-Y1R</b>	Récepteur du NPY de type 1
<b>NSO</b>	Neurone Sensoriel Olfactif
<b>PBS (T)</b>	Phosphate Buffered Saline (et Triton)
<b>PVDF</b>	Polyvinylidene Fluoride
<b>RIPA</b>	Radio-Immunoprecipitation Assay
<b>SB 2X</b>	Sample Buffer 2X
<b>SDS</b>	Sodium Dodécyl Sulfate
<b>SNC</b>	Système Nerveux Central
<b>TBS (T)</b>	Tris Buffered Saline (et Tween 20)
<b>V-Glut2</b>	Transporteur Vésiculaire du Glutamate



## FIGURES et TABLEAUX

- Figure 1 :** Schéma du bulbe olfactif et de ses couches cellulaires [16]
- Figure 2 :** Protocole d'odorisation [15]
- Figure 3 :** Dissection et perfusion du rat [17]
- Figure 4 :** Extraction du cerveau de rat [17]
- Figure 5 :** Etapes de préparation du protocole d'immunohistochimie
- Figure 6 :** Plan des coupes au cryostat
- 
- Figure 7-A :** Effet du jeûne sur le poids corporel
- Figure 7-B :** Effet du jeûne sur la glycémie
- Figure 7-C :** Effet du jeûne sur la leptinémie
- Figure 7-D :** Effet du jeûne sur le comportement (reniflage)
- 
- Figure 8 :** Co-localisation NPY-Y1R et GFAP (IHC)
- 
- Figure 9-A :** Effet du jeûne sur GFAP (Western blot)
- Figure 9-B :** Effet du jeûne sur GLAST (Western blot)
- Figure 9-C :** Effet du jeûne sur GS (Western blot)
- Figure 9-D :** Effet du jeûne sur NPY-Y1R (Western blot)
- 
- Figure 10 :** Photos en Hoechst de glomérules dorsaux du BO (5X) (IHC)
- Figure 11 :** Photos GFAP/Hoechst de glomérules dorsaux du BO (20X) (IHC)
- Figure 12 :** Photos GFAP/Hoechst de glomérules ventraux du BO (20X) (IHC)
- Figure 13 :** Effet du jeûne sur le déploiement astrocytaire des glomérules de BO (IHC)
- Figure 14 :** Schéma de l'organisation des récepteurs et glomérules olfactifs [28]
- Figure 15 :** Effet du jeûne sur la taille des glomérules de BO (IHC)
- 
- Figure 16 :** Plasticité morphologique astrocytaire dans le noyau supra-chiasmatique [10]
- Figure 17 :** Plasticité morphologique astrocytaire dans le noyau supra-optique [27]
- 
- Figure 18 :** Domaines dorso-ventraux de glomérules olfactifs [18]
- 
- Tableau 1 :** Anticorps utilisés pour les Western Blot
- Tableau 2 :** Anticorps utilisés pour l'immunohistochimie

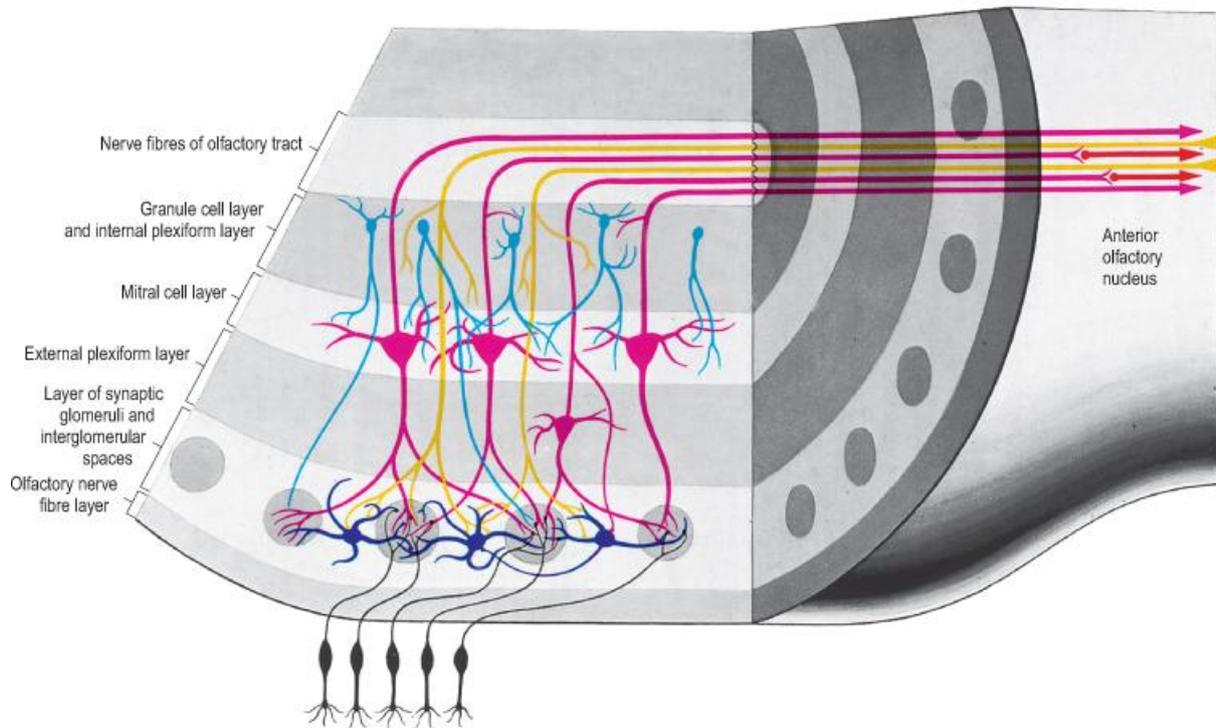


## SOMMAIRE

Avant-propos et remerciements.....	1
ABREVIATIONS .....	2
FIGURES et TABLEAUX.....	3
<b>INTRODUCTION</b> .....	6
Hypothèse.....	9
Objectifs .....	9
<b>MATERIELS ET METHODES</b> .....	10
<b>I. Modèles animaux</b> .....	10
I.1. Conditions d'élevage.....	10
I.2. Modèle expérimental de jeûne/satiété.....	10
I.3. Protocole d'odorisation.....	10
I.4. Etude comportementale.....	10
<b>II. Paramètres physiologiques</b> .....	11
II.1. Croissance pondérale.....	11
II.2. Glycémie.....	11
II.3. Leptinémie.....	11
<b>III. Western Blot</b> .....	12
III.1. Préparation des échantillons et dosage des protéines.....	12
III.2. Migration électrophorétique et transfert.....	12
IV.3. Hybridation et immunodétection.....	13
<b>IV. Marquage immunohistochimique</b> .....	13
IV.1. Fixation des cerveaux par perfusion intracardiaque.....	14
IV.2. Coupes histologiques.....	14
IV.3. Immunomarquages : c-Fos et GFAP.....	14
IV.4. Acquisition des images et quantification de la GFAP.....	16
<b>V. Analyses statistiques</b> .....	16
<b>RESULTATS</b> .....	17
<b>I. Paramètres physiologiques</b> .....	17
I.1. Effet du jeûne sur le poids corporel.....	17
I.2. Effet du jeûne sur la glycémie.....	17
I.3. Effet du jeûne sur la leptinémie.....	17
<b>II. Western Blot</b> .....	18
II.1. Effet du jeûne sur GLAST et GS.....	18
II.2. Effet du jeûne sur GFAP et NPY-Y1R.....	18
<b>III. Immunohistochimie sur coupes cérébrales</b> .....	19
III.1. Observation qualitative.....	19
III.2. Analyse quantitative : effet du jeûne sur l'aire GFAP/glomérule.....	20



<b>DISCUSSION</b> .....	21
MODELE de JEÛNE-SATIÉTÉ .....	21
PLASTICITÉ MORPHOLOGIQUE ASTROCYTAIRE des glomérules olfactifs .....	25
SYNAPSE GLUTAMATERGIQUE : Régulation des marqueurs astrocytaires .....	27
NPY-Y1R : INTEGRATION d'UN SIGNAL NEUROENDOCRINE .....	28
<b>CONCLUSION et PERSPECTIVES</b> .....	30
<b>Références bibliographiques</b> .....	32



© Elsevier Ltd 2005. Standing: Gray's Anatomy 39e - www.graysanatomyonline.com

**Figure 1: Schéma du bulbe olfactif et de ses couches cellulaires [16]**

Le bulbe olfactif est organisé en couches cellulaires circulaires, avec successivement de la périphérie vers le centre : la couche des nerfs olfactifs constituée des axones des neurones sensoriels olfactifs entourés de cellules engainantes; la couche glomérulaire où les terminaisons axonales des neurones sensoriels olfactifs forment des synapses glutamatergiques avec les dendrites des cellules mitrales, les cellules principales du BO, et des cellules périglomérulaires (essentiellement des interneurons GABAergiques et DOPAminergiques) ; la couche plexiforme externe; la couche des corps cellulaires des cellules mitrales; la couche plexiforme interne et la couche des cellules granulaires.

[tiré de GRAY'S ANATOMY, 40th Edition. *The Anatomical Basis of Clinical Practice* (2009)]

## INTRODUCTION

La question d'une alimentation équilibrée et nutritionnelle pour toutes les populations est devenue cruciale, alors que la prévalence du surpoids et de l'obésité, ainsi que la dénutrition chez la personne âgée, deviennent des problèmes majeurs de santé publique. C'est dans ce contexte que nous cherchons à approfondir les connaissances sur les nombreux paramètres mis en jeu dans la prise alimentaire.

Dans le cadre d'études des liens entre olfaction et prise alimentaire, le laboratoire N.B.O. s'intéresse aux interactions entre les régulations homéostatiques (liées à l'état nutritionnel nourri ou à jeun) et les sensations hédoniques (système sensoriel captant des stimuli environnementaux). La modulation de la sensibilité olfactive selon le statut métabolique a été démontrée par un certain nombre d'analyses comportementales et électrophysiologiques [1]. Il a ainsi été observé chez l'Homme que la capacité olfactive est influencée par les sensations de faim ou de rassasiement: Cabanac et Duclaux ont introduit le concept d'alliesthésie olfacto-gustative, énonçant ainsi le rôle de la valeur hédonique perçue d'un aliment et sa modulation en fonction de l'état nutritionnel : à jeun, l'alliesthésie est positive, le plaisir anticipé associé à la prise alimentaire nous pousse à nous nourrir ; rassasié, l'alliesthésie est négative, nous incitant à freiner voire arrêter la prise alimentaire. La perception olfactive intervient donc dans la satiété olfactive pour nous aider à manger moins lorsque cela n'est pas nécessaire [2]. Par ailleurs, des personnes anosmiques ou hyposmiques (perte totale ou partielle de la faculté olfactive) affirment manger moins, probablement en lien avec une sensation de faim non exacerbée par des odeurs alimentaires [3] ; des femmes enceintes deviennent hyperosmiques (augmentation de la sensibilité olfactive), probablement pour favoriser le bien-être et le développement du fœtus, dépendants de l'environnement nutritionnel maternel [4]. Les bases physiologiques de ces modifications de la sensibilité olfactive ne sont que partiellement connues. Elles supposent la mise en œuvre de processus de plasticité dans les structures traitant les signaux olfactifs, incluant la muqueuse (MO) et le bulbe (BO) olfactifs. Si quelques études récentes ont contribué à démontrer cette plasticité au niveau de la MO [1], la présence de modulations comparable n'est que partiellement décrite au niveau du BO, qui intègre les stimuli provenant de la MO et les transmet ensuite à d'autres aires cérébrales en aval (le cortex piriforme par exemple).

Le bulbe olfactif est constitué de plusieurs couches neuronales concentriques : les couches des nerfs olfactifs, glomérulaire, plexiforme externe, mitrale, plexiforme interne et



celle des cellules granulaires (*fig.1*). Il est le premier site d'intégration et de modulation des stimuli olfactifs : le bulbe olfactif, juste derrière l'os ethmoïde séparant le cerveau de la cavité nasale, reçoit les afférences des neurones sensoriels olfactifs de la muqueuse olfactive, celles-ci formant des synapses glutamatergiques avec les dendrites des cellules mitrales qui elles-mêmes envoient leurs prolongements nerveux dans les zones plus centrales telles que les tractus et tubercule olfactifs et autres régions corticales [5, 6, 7].

Au niveau du bulbe olfactif, aux côtés des neurones, les astrocytes pourraient être l'un des éléments de support de la plasticité permettant l'adaptation de la sensibilité olfactive à l'état nutritionnel. Les astrocytes, principales cellules gliales du système nerveux, assurent de nombreuses fonctions régulatrices sur la neurotransmission : soutien énergétique des neurones, régulation de l'activité synaptique, protection neuronale et stabilisation des synapses. Les astrocytes sont aujourd'hui reconnus comme des partenaires à part entière de la synapse glutamatergique [8] et sont considérés comme des méta-régulateurs de la neurotransmission dans le système nerveux central, notamment en coordonnant des réseaux neuronaux en réponse à des stimuli hormonaux et environnementaux [9]. Les glomérules du bulbe olfactif regroupent les synapses glutamatergiques entre neurones olfactifs et cellules mitrales, dont l'activité est modulée par les arborisations des neurones péri-glomérulaires et le déploiement de nombreux prolongements astrocytaires.

Plusieurs observations permettent de penser que les astrocytes glomérulaires pourraient jouer un rôle dans l'adaptation de la sensibilité olfactive à l'état nutritionnel. L'impact du déploiement astrocytaire en lien avec des signaux physiologiques et/ou sensoriels (lactation, déshydratation et soif, entrainement du rythme circadien par la lumière...) a été démontré dans certains noyaux hypothalamiques, dans les situations qui requièrent l'adaptation de l'organisme à son environnement [10, 11].

La régulation astrocytaire des synapses glutamatergiques s'exerce à plusieurs niveaux : des systèmes de transport spécifiques permettent aux astrocytes de contrôler, entre autres, les concentrations de glutamate et de potassium libérés dans l'espace péri-synaptique, ce qui impacte directement l'efficacité de la neurotransmission. Le glutamate capté par les astrocytes est ensuite redistribué aux neurones sous forme de glutamine, via l'activité de la glutamine synthase [12]. Les astrocytes possèdent également des récepteurs du glutamate qui induisent, via des signaux calciques, la libération de gliotransmetteurs régulant en retour l'activité synaptique. Ces régulations astrocytaires de la synapse dépendent aussi de l'étendue du compartiment astrocytaire déployé autour de la synapse. L'astrocyte est en effet capable de



déployer ses prolongements et filaments périphériques ou au contraire de les rétracter, ce qui va moduler l'espace péri-synaptique et renforcer ou relâcher le contrôle exercé par l'astrocyte sur la synapse.

L'organisation spatiale très fine des astrocytes au niveau des glomérules suggère une implication fonctionnelle intimement liée à l'activité synaptique : on note une compartimentation ou ségrégation des filaments astrocytaires dans des glomérules bien distincts les uns des autres; on observe également la morphologie orientée des fins filaments astrocytaires vers le centre des glomérules, là où les synapses sont le plus concentrées [10, 12, 13]. Dans les glomérules du bulbe olfactif, où les synapses principales sont glutamatergiques, l'activation neuronale induit le couplage et l'activation des prolongements astrocytaires présents dans les glomérules [13]. La capture du glutamate via les transporteurs astrocytaires GLAST semble essentielle à l'activation neuronale et aux oscillations générées dans le bulbe olfactif [12,13, 14].



## ***Hypothèse***

Pour mieux comprendre les mécanismes reliant la sensibilité olfactive à l'état de jeûne-satiété, nous émettons l'hypothèse que la plasticité astrocytaire (déploiement-rétraction des prolongements) décrite par ailleurs dans d'autres systèmes d'adaptation, participe à la modulation de la neurotransmission glutamatergique dans le BO.

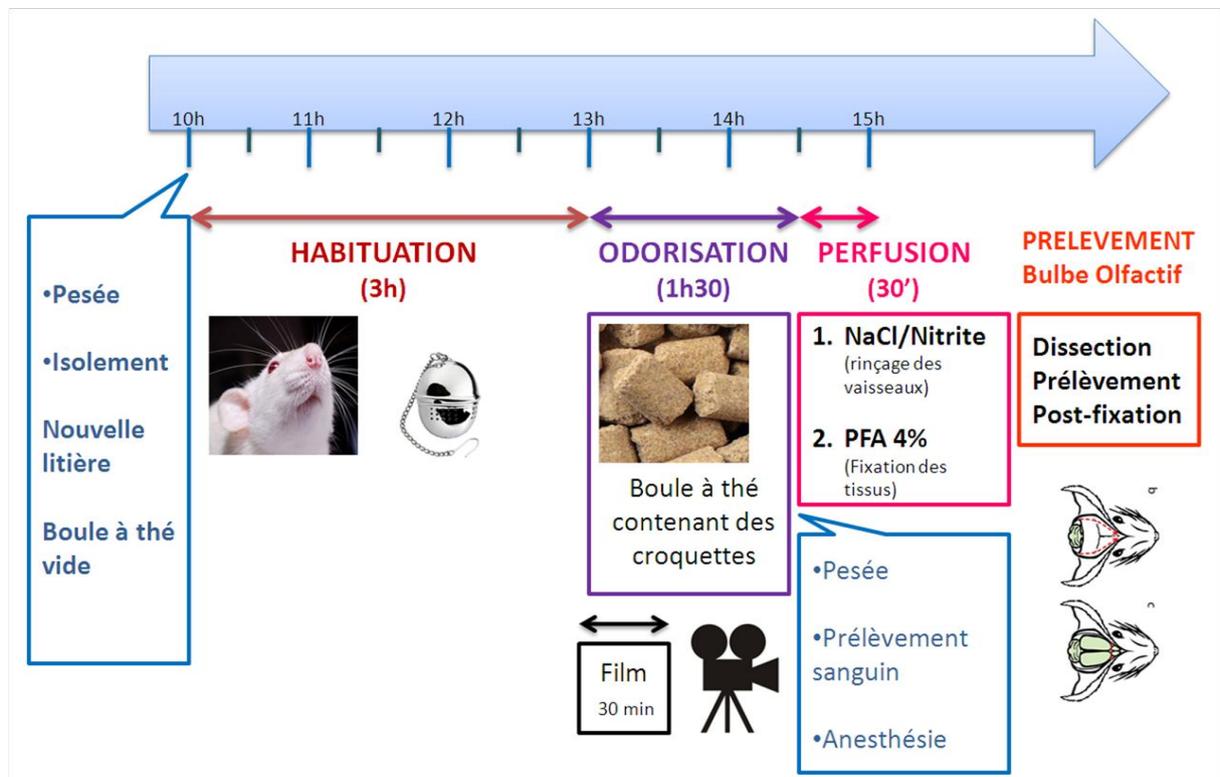
## ***Objectifs***

Pour mettre en évidence le rôle des astrocytes dans la modulation de la sensibilité olfactive en fonction de l'état nutritionnel, nous avons comparé le déploiement des prolongements astrocytaires et l'expression de marqueurs des régulations astrocytaires, au sein des glomérules du bulbe olfactif chez des rats nourris ou à jeun.

## ***Méthodologie***

Mon travail a consisté :

- 1) à caractériser l'état de jeûne chez des rats soumis à des durées de jeûne croissantes (17, 24 ou 48h), en mesurant :
  - la motivation alimentaire (test comportemental de détection olfactive)
  - la perte de poids corporel
  - la leptinémie
  - la glycémie
- 2) à comparer le déploiement et l'activité astrocytaires dans les glomérules du BO de ces rats nourris ou à jeun, en mesurant :
  - le déploiement des prolongements astrocytaires (analyse de la GFAP, protéine acide des gliofilaments, par immunohistochimie de coupes du bulbe olfactif)
  - l'expression des marqueurs astrocytaires impliqués dans la régulation de la synapse glutamatergique (par western blot : GLAST, GS, GFAP)
  - l'expression des récepteurs astrocytaires du NPY, facteur orexigène (par western blot : NPY-Y1R)
  - l'activation glutamatergique neuronale (par immunomarquage de la protéine c-Fos sur des coupes du bulbe olfactif, après stimulation olfactive des animaux).



**Figure 2 : Protocole d'odorisation pour l'activation glomérulaire [15]**

Après pesée des animaux, ceux-ci sont isolés dans des cages propres et privés de nourriture (ils ont cependant toujours accès à leur biberon d'eau), et placés dans une autre pièce de l'animalerie, sans odeur apparente de nourriture. C'est la phase d'habituation. Ensuite, la stimulation olfactive a lieu pendant la phase d'odorisation où les boules à thé sont remplies de croquettes alimentaires, cette phase dure 90mins, ce qui correspond à la durée nécessaire pour atteindre le pic d'expression de la protéine c-Fos dans les neurones activés [15]. Au bout de ces 90 mins, l'animal est profondément anesthésié puis disséqué et perfusé (rinçage avec du NaCl/Nitrite puis fixation des tissus avec du paraformaldéhyde (PFA) à 4%). Enfin les bulbes olfactifs (et le cerveau) sont délicatement prélevés et conservés dans du PFA 4% (24h de post-fixation) puis cryoprotégés dans du sucrose avant la coupe au cryostat.

[Adapté du protocole d'odorisation de M.J. Prud'Homme *et al.* (2009)]

# MATERIELS et METHODES

## I. Modèles animaux

### I.1. Conditions d'élevage

Les rats mâles Wistar sont élevés dans l'animalerie de l'unité de Neurobiologie de l'Olfaction (N.B.O.) de l'I.N.R.A. de Jouy-en-Josas. Les conditions d'élevage et de sacrifice des animaux sont conformes aux directives de la CEE (86/609//CEE). Les animaux ont libre accès à la nourriture et à l'eau et sont élevés dans des pièces contrôlées en température ( $22 \pm 1^\circ\text{C}$ ), hygrométrie ( $50 \pm 10\%$ ) et lumière (alternance lumière/obscurité de 12 heures).

### I.2. Modèle expérimental de jeûne/satiété

Les rats utilisés ont entre 5 et 7 semaines, ce qui correspond à un stade où les réseaux astrocytaires sont suffisamment formés pour notre étude. Au moment de l'expérimentation, les rats sont soit en situation de satiété (nourris *ad libitum*) soit à jeun depuis 17h, 24h ou 48h (privés de croquettes alimentaires mais toujours en présence d'eau). Les expérimentations sont réalisées sur plusieurs vagues successives de 8 rats.

### I.3. Protocole d'odorisation (fig.2, adapté de [15])

Les rats sont répartis en quatre groupes (2 rats/groupe) : i) rats nourris non soumis au protocole d'odorisation (contrôle), ii) rats nourris soumis au protocole d'odorisation, dits « odorisés » ; iii) rats à jeun depuis 24h « odorisés » ; iv) rats à jeun depuis 48h « odorisés ». Les rats soumis au protocole d'odorisation sont placés 3h en « habitude », dans une salle sans odeur alimentaire, dans une cage propre sans nourriture et en présence d'une boule à thé vide ; puis ils sont soumis à 1h30 d'odorisation, placés en présence d'une odeur (ici alimentaire : ajout de croquettes alimentaires dans les boules à thé). Les rats contrôles sont maintenus dans leur environnement mais sans aliment et en présence d'une boule à thé vide, pour être dans les mêmes conditions que les rats dits « odorisés ». Après le protocole d'odorisation, les rats sont anesthésiés avec une dose sub-létale de pentobarbital ( $200\mu\text{L}/100\text{g}$  de masse corporelle) et transportés à la salle de perfusion.

### I.4. Etude comportementale (fig.2)

Les animaux, à jeun ou nourris, sont placés dans des cages propres et en présence d'odeurs alimentaires : on dépose 4 à 5 croquettes alimentaires dans un boule à thé, cachée dans la sciure. L'activité des rats est filmée pendant 15 minutes et le temps de reniflage est quantifié



par la mesure du temps passé à renifler la boule à thé, exprimé en pourcentage du temps total (15 min).

## **II. Paramètres physiologiques**

### **II.1. Croissance pondérale**

Pour évaluer les variations de poids au cours du jeûne, les animaux à jeun ou nourris sont pesés une première fois deux jours avant la mise en place du protocole d'odorisation (cf. I.3) puis une deuxième pesée est réalisée le matin de l'expérimentation.

### **II.2. Glycémie**

Pour évaluer les variations de glycémie dans nos modèles de mise à jeun, la glycémie est mesurée sur une goutte de sang prélevée au niveau de la veine caudale grâce à un lecteur de glycémie (*Dextro*), la majorité des mesures étant réalisée l'après-midi soit pendant la phase de repos des animaux.

### **II.3. Leptinémie**

#### **II.3.1. Prélèvement et préparation des échantillons plasmatiques**

Le sang est prélevé au niveau de la veine caudale et recueilli dans des tubes héparinés, ceux-ci sont centrifugés 10 mins à 4000 rpm et à 4°C puis le plasma est aliquote (500-1000 µL/rat) et conservé à -80°C.

#### **II.3.2. Dosage ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay)**

Le dosage de la leptine plasmatique est effectué grâce au kit ELISA pour leptine de rat (*Crystal Chem Inc.*) : la leptine est simultanément reconnue et liée à l'anticorps anti-leptine (fait chez le lapin) qui tapisse le fond des puits puis selon le principe d'une ELISA en sandwich, les épitopes restants de la leptine sont reconnus et fixés par un anticorps IgG anti-leptine (fait chez le cochon d'Inde). L'anticorps secondaire anti-IgG de cochon d'Inde se fixe à l'anticorps primaire IgG anti-leptine ; cet anticorps secondaire est couplé à une enzyme, la peroxydase (HRP : horse radish peroxidase) et la leptine est révélée par une réaction colorée après addition du substrat tétraméthylbenzidine. Plusieurs étapes de rinçages intermédiaires sont effectuées au cours du dosage pour éliminer les excès d'anticorps primaire et secondaire non liés. La mesure de l'absorbance à 450 nm corrigée par une mesure à 620 nm nous permet le calcul des concentrations de leptine (ng/mL) des échantillons plasmatique étudiés, selon une régression non linéaire *cubic spline* (sous le logiciel Graph Pad Prism 5).



### **III. Western Blot**

#### **III.1. Préparation des échantillons et dosage des protéines**

Lors des prélèvements, les BO sont pesés et congelés à sec dans de l'azote liquide : les échantillons peuvent ainsi être conservés à -80°C. L'extraction des protéines est réalisée par potterisation dans un tampon d'extraction RIPA (Radio-Immunoprecipitation Assay, *SIGMA*) additionné d'antiprotéases (*ROCHE*), permettant une lyse cellulaire efficace et la solubilisation des protéines.

Les protéines totales sont alors dosées grâce à un test colorimétrique (DC-Protein Assay, kit *Biorad*), basé sur la méthode de Lowry : les protéines en milieu alcalin réagissent avec les ions cuivre en solution puis le réactif de Folin est réduit par le cuivre qui a préalablement réagi avec les protéines. Sur une plaque de 96 puits, 5µL d'échantillon sont déposés en duplicat. Chaque puits est complété par 25µL de solution A' (solution A : solution alcaline de tartrate de cuivre, additionnée de solution S : un détergent) puis par 200µL de solution B (le réactif de Folin dilué). Finalement, une coloration bleue est observée, elle est due aux acides aminés tyrosines et tryptophanes des protéines et est mesurée par spectrophotométrie à 660 nm (Técan). Une gamme étalon de BSA (Albumine du Sérum Bovin 0-2 mg/mL) est dosée en parallèle.

Les échantillons, ajustés à la même concentration, sont dilués au ½ dans une solution de Sample Buffer SB 2X (2,5mL de Tris HCl à 0,5mM ; 2mL de SDS 20% ; 2mL de glycérol ; 3mL d'eau ultrapure), additionnée de Dithiothreitol (DTT ; 50µL de DTT pour 950µL de SB 2X). Le SDS (Sodium Dodécyl Sulfate) contenu dans le SB 2X est un détergent anionique qui dénature les protéines et les charge négativement ; le DTT est un agent réducteur qui rompt les ponts disulfure des protéines.

#### **III.2. Migration électrophorétique et transfert**

Lors de la migration sur gel, les protéines sont séparées selon leur poids moléculaire. Les échantillons et marqueurs de poids moléculaire (Precision Plus Protein™ Standards, All Blue, *Biorad*) sont déposés sur un gel précoulé Tris-HCl à gradient d'acrylamide 4-15% (*Biorad*). L'électrophorèse est réalisée dans un tampon de migration (25 mM Tris, 192 mM Glycine et 0.1% (w/v) SDS ; pH=8,3), à 200 Volts pendant 1h à température ambiante.

Puis les protéines sont transférées sur une membrane PVDF (Polyvinylidene Fluoride Membrane, Immobilon-P, *Millipore*), préalablement perméabilisée par trois bains successifs dans de l'éthanol 100%, de l'eau ultra-pure et du tampon de transfert (25 mM Tris, 192 mM Glycine, 20% éthanol ; pH=8.3). Le gel et la membrane sont placés entre des couches

<b>Anticorps</b>	<b>Dilution</b>	<b>Fournisseur</b>
Anti-NPY-Y1R (chez lapin)	1/500	<i>Abcam</i> , France
Anti GFAP (chez souris)	1/1000	<i>Sigma-Aldrich</i> , Saint-Quentin Fallavier, France
Anti V-Glut2 (chez souris)	1/500	<i>Millipore</i> , France
Anti GLT-1 (chez lapin)	1/1000	<i>Cell Signaling Technology, Inc.</i> France
Anti GLAST (chez lapin)	1/1000	<i>Abcam</i> , France
Anti GS (chez souris)	1/500	<i>Millipore</i> , France
Anti actine (chez souris)	1/5000	<i>Sigma-Aldrich</i> , Saint-Quentin Fallavier, France
Anticorps anti-souris (HRP)	1/60000	<i>Jackson</i> , France
Anticorps anti-lapin (HRP)	1/30000	<i>Jackson</i> , France

**Tableau 1: Anticorps utilisés pour les Western Blots.**

successives de papiers Whatman et Scotch-Brit dans une cassette de transfert immergée dans une cuve contenant du tampon de transfert. Le transfert est effectué à 20 Volts la nuit à 4°C.

### **III.3. Hybridation et immunodétection**

La **saturation** des sites non spécifiques est réalisée par incubation des membranes dans une solution de tampon TBST (Tris Buffered Saline à pH 7,2 : tris HCl 20mM ; NaCl 0,8%, Tween 20 0,1%) additionné de 5% de lait écrémé en poudre, pendant 2 heures à température ambiante et sous agitation.

Les membranes sont incubées avec l'**anticorps primaire** spécifique de la protéine d'intérêt dilué dans du TBST-lait 5%, pendant 2h à température ambiante (ou la nuit à 4°C). Après les rinçages en TBST, les membranes sont incubées avec l'**anticorps secondaire** correspondant, dilué dans du TBST, pendant 2h à température ambiante. L'anticorps secondaire est spécifique de l'espèce animale de l'anticorps primaire utilisé et est couplé à une peroxydase. Les anticorps utilisés sont résumés dans le tableau 1.

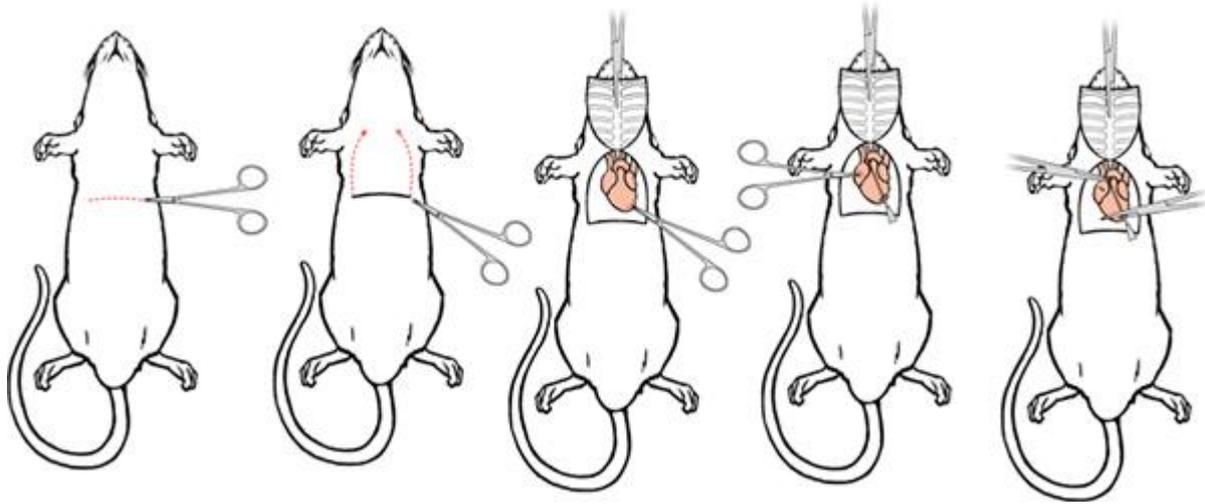
La **révélation** est réalisée par chemiluminescence (Clarity Western ECL, *Biorad*) : l'enzyme peroxydase de l'anticorps secondaire réagit avec son substrat pour donner un produit luminescent. On peut alors directement observer les membranes grâce à la caméra Fujifilm LAS1000 en chemiluminescence (pour une analyse semi-quantitative directe) puis en fluorescence (pour la visualisation de marqueur de poids moléculaire). Les bandes d'intérêt sont quantifiées grâce au logiciel Aida Image Analyser.

## **IV. Marquage immunohistochimique (fig.6)**

Le protocole d'immunohistochimie est réalisé sur des rats préalablement soumis au protocole d'odorisation, afin de tenter de relier le déploiement astrocytaire dans les différentes conditions (nourris/à jeun) à l'activation glomérulaire (induite par odorisation). Le déploiement astrocytaire est visualisé grâce au marquage fluorescent de la GFAP (Glial Fibrillar Acidic Protein) et l'activation glomérulaire grâce au marquage de la protéine c-Fos en DAB (Diaminobenzidine) ou en fluorescence.

Pour le marquage c-fos, plusieurs essais ont été réalisés (selon le protocole précisé ci-dessous), cependant le marquage final n'étant pas satisfaisant, je présenterai uniquement les résultats issus de l'immunomarquage GFAP.

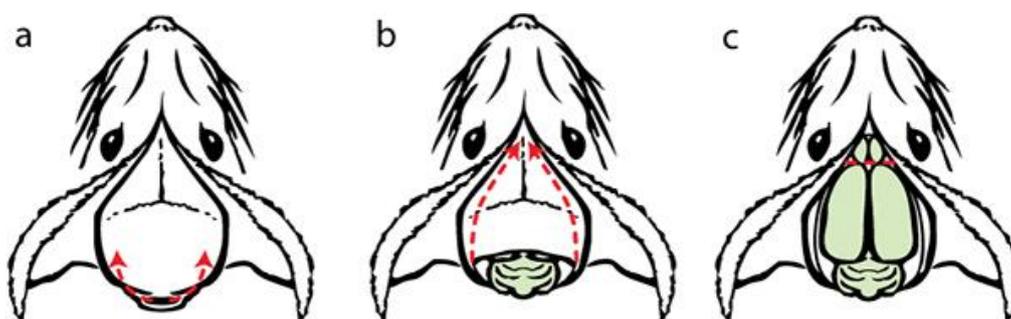




**Figure 3 : Etapes de dissection et de perfusion du rat [17]**

Après vérification de l'état d'anesthésie du rat, on procède à sa dissection. On commence par des incisions larges au niveau de l'abdomen afin de dégager la cage thoracique. La cage thoracique est découpée, et soulevée par le sternum, afin de bien visualiser le cœur et les aortes. Une petite incision du ventricule gauche est alors réalisée, une aiguille de perfusion y est insérée et le cœur est clampé ; enfin l'atrium droit est incisé. L'animal est alors perfusé via l'incision du ventricule gauche.

[Tiré de Gage G.J. *et al.* (2012)]



**Figure 4 : Extraction du cerveau du rat [17]**

Avec beaucoup de précaution, on incise les bords de la boîte crânienne. En ouvrant la boîte crânienne, on fait attention à ne pas endommager le cerveau qui se dégage par la partie postérieure. Une fois le cerveau entièrement dégagé, la spatule nous permet d'extraire le cerveau en conservant les 2 bulbes olfactifs attachés.

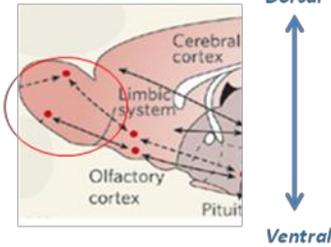
[Tiré de Gage G.J. *et al.* (2012)]

## Figure 5 : Etapes de préparation du protocole d'immunohistochimie

1

Congélation  
Coupe (Cryostat -20°C)

Bulbe olfactif de rat



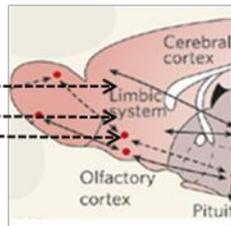
Les bulbes olfactifs attachés au cortex sont congelés dans de l'isopentane (-40°C à -35°C) puis déposés sur un socle, face dorsale vers le haut. Le tissu congelé est maintenu en place grâce à du Tissue Tek (O.C.T. Compound, *Sakura*).

L'ensemble socle/tissu congelé est placé dans le cryostat où l'on procède à la coupe des tranches fines de 20 µm.

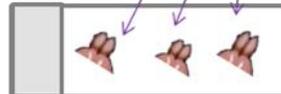
Nous réalisons des coupes cérébrales sériées dans la partie dorsale, au milieu et dans la partie ventrale. Les coupes sont déposées sur une lame gélatinée. On dépose 3 coupes par lame.

Coupe du côté dorsal

Coupe du côté ventral



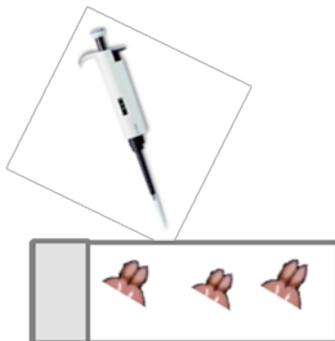
3 coupes cérébrales  
par lame



Les coupes montées sur lame sont conservées à -20°C jusqu'à l'immunomarquage.

2

Protocole d'immunohistochimie  
sur coupes cérébrales

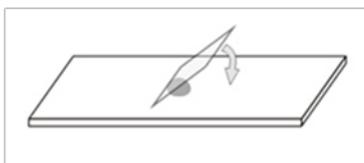


Saturation

Rinçages successifs  
(PBS)

Anticorps  
Anti-GFAP-Cy3  
Anti-Fos

Marquage des  
noyaux: Hoechst

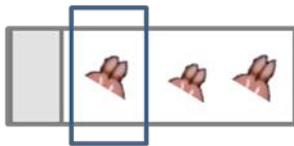


Les lames traitées sont montées sous lamelle fine puis conservées à l'obscurité (à 4°C pour la fluorescence; à température ambiante pour la révélation DAB).

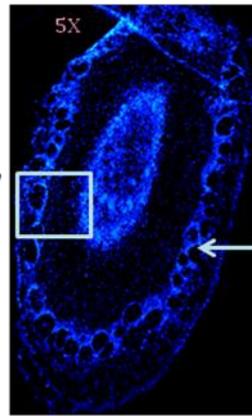
3

### Prise de vue

Des prises de vue aux objectifs 5X et 20X sont effectuées sur les BO gauches de chacune des coupes.



On prend des photos des glomérules d'1 coupe à la fois.

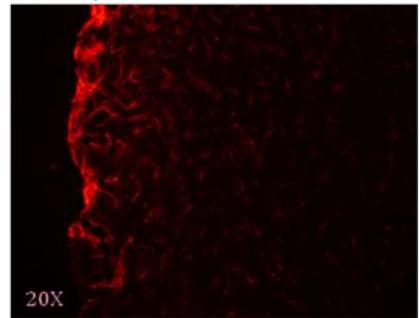
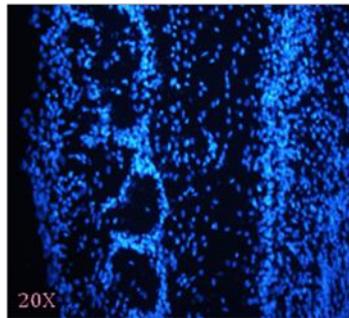


Le BO entier est reconstitué à partir de 2 à 3 photos en Hoechst (5X)

Couche glomérulaire

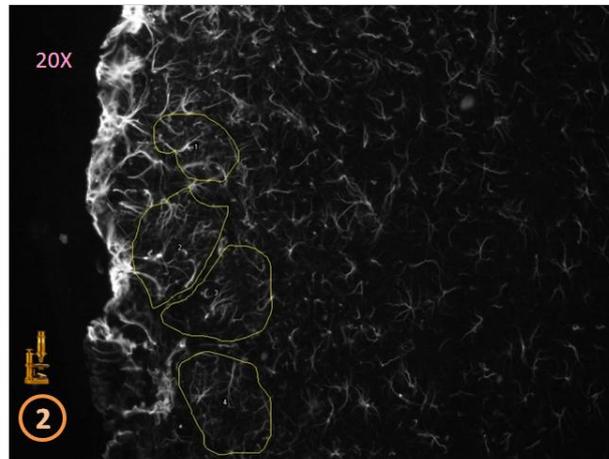
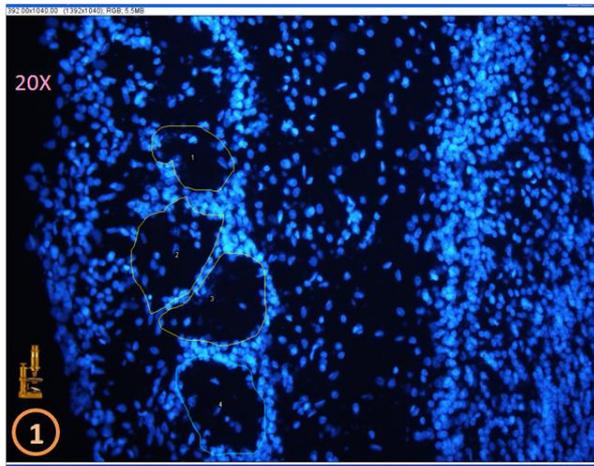
Tout au long de la couche glomérulaire, on prend des photos au 20X Hoechst (ex: encadré clair ci-dessus)

Pour chaque prise de vue en Hoechst, on réalise exactement au même endroit, une photo avec un filtre permettant la visualisation de la GFAP



4

### Quantification et analyse



Les ROI étant sauvegardés, on les superpose à la photo GFAP traitée en noir et blanc (*split channels*).

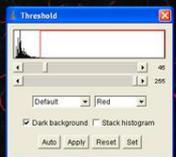
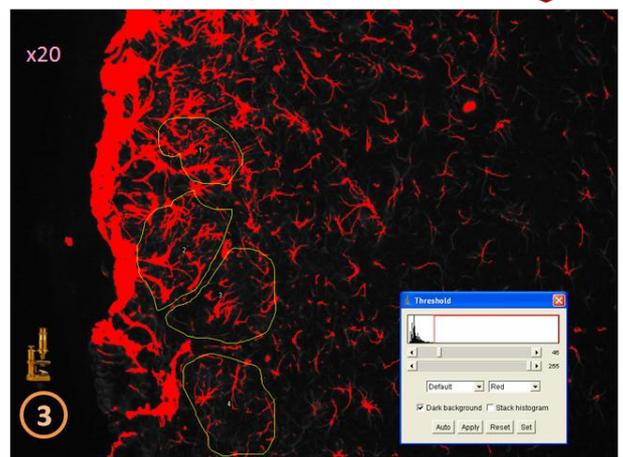
Un seuil du marquage mesuré est fixé.

Dans le logiciel *ImageJ*, on délimite des zones d'intérêt (ROI) correspondant aux glomérules. Les glomérules sont les zones ovales délimitées par les noyaux marqués par le Hoechst.

Enfin, *ImageJ* calcule l'aire totale de chaque ROI (Area) et l'aire marquée selon le seuil (%Area). A chaque ligne correspond un ROI (1 glomérule).

Area	%Area
1 20620	31.149
2 35549	24.203
3 34777	9.291
4 36115	7.064

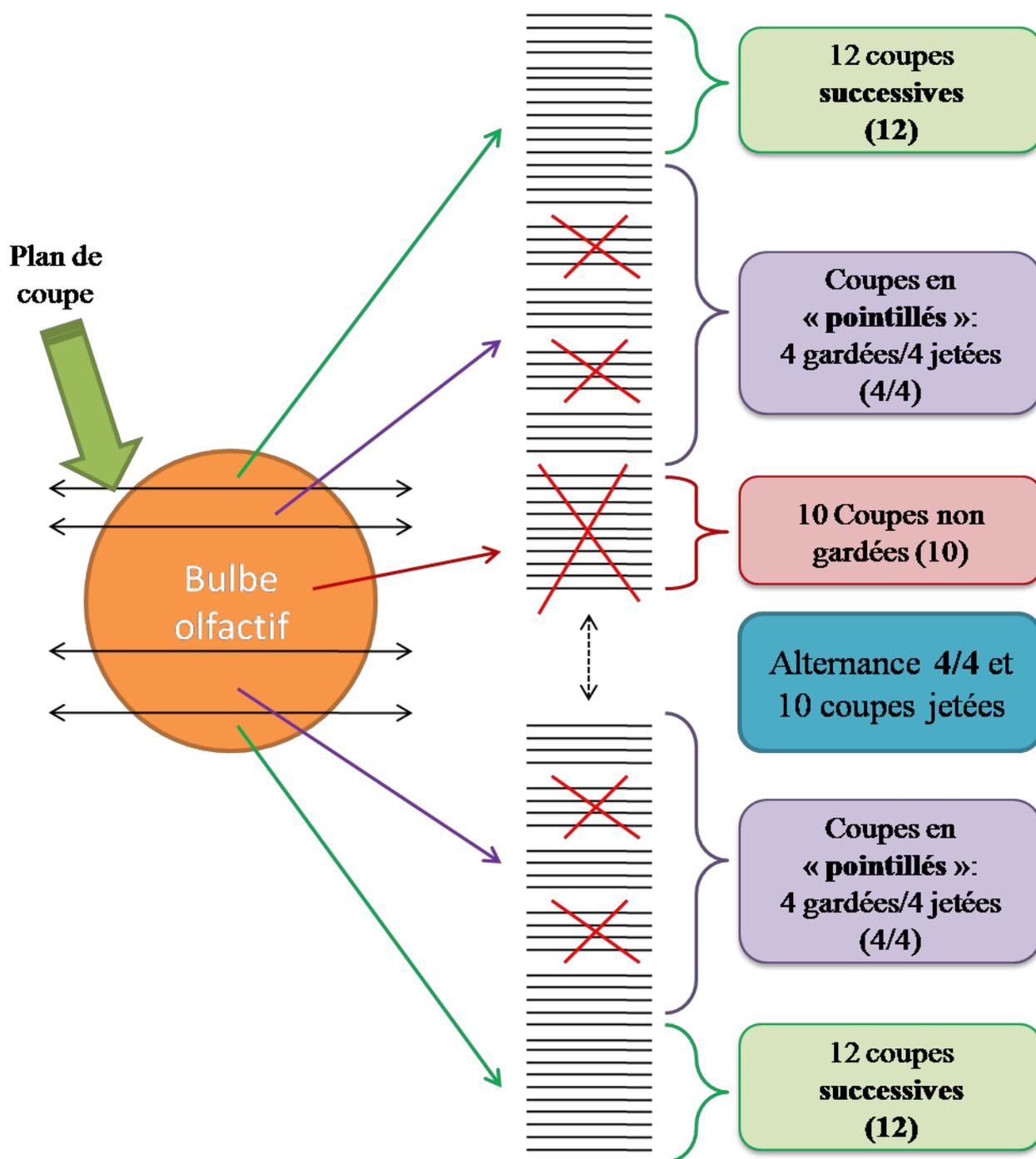
- Excel:** calcul des aires GFAP/ROI
- GraphPad Prism:** analyse



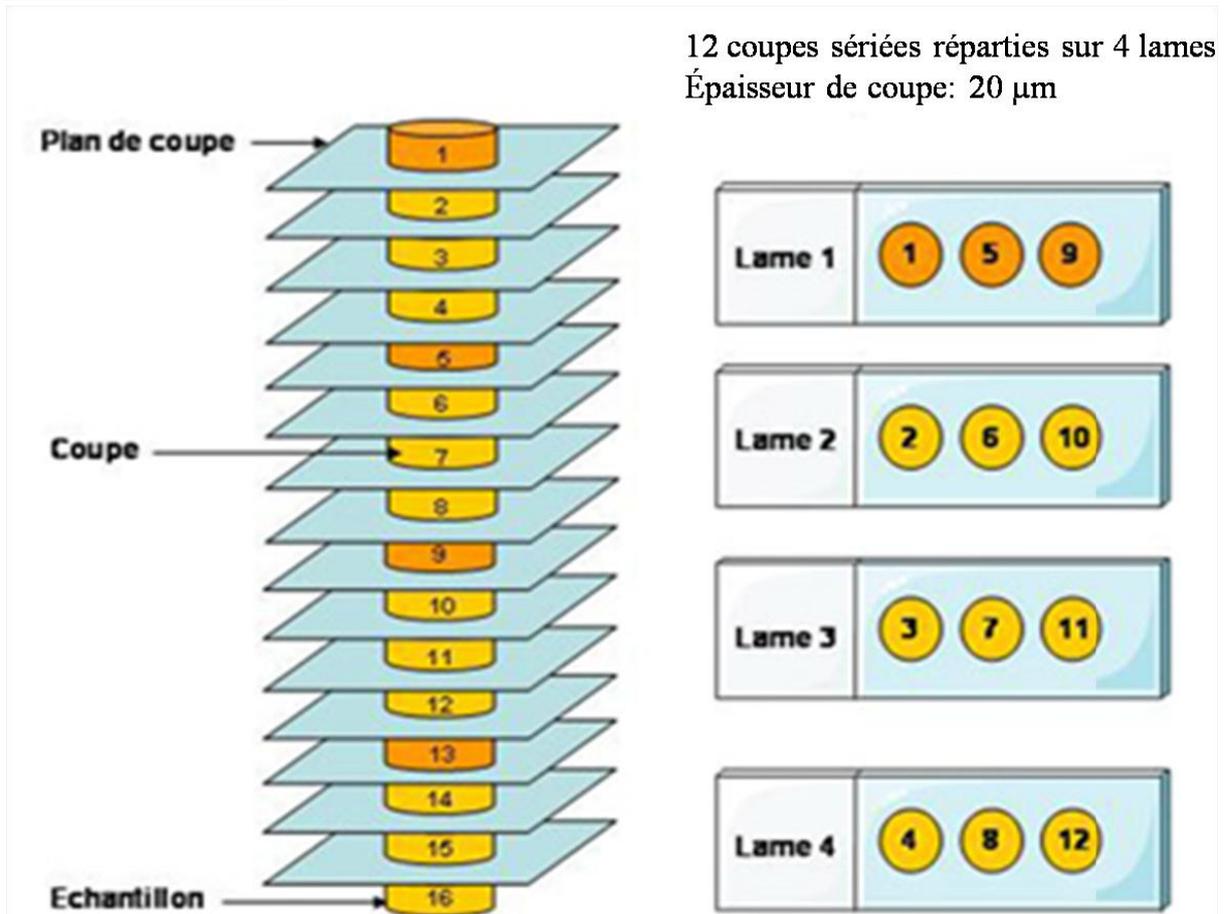
**Figure 6 : Plan de coupe au cryostat**

**a) Organisation et plan des coupes sériées (épaisseur de coupe : 20  $\mu$ m)**

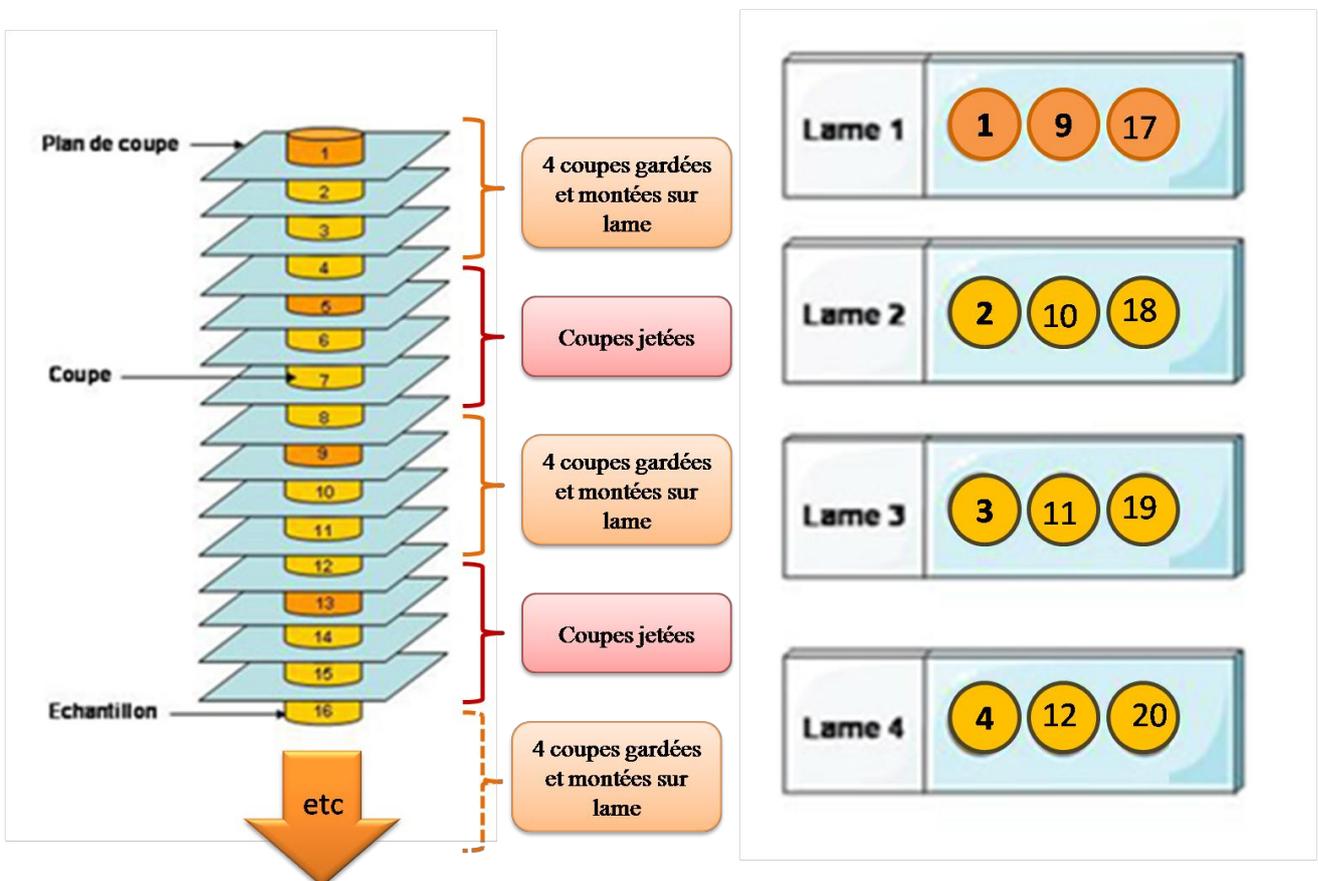
Le BO étant positionné la face ventrale vers la platine du cryostat, on procède à la coupe en alternant des zones de **coupes sériées successives** et des zones de coupes sériées « en pointillés ». On reconstitue ainsi certaines zones du bulbe olfactif en répartissant les coupes successives par série de 4 lames, en déposant 3 coupes par lame. Notre objectif étant de réaliser des marquages immunologiques au niveau des glomérules et sachant la position de cette couche (cf. *figure 1*), le plan de coupe est le suivant :



**b) Coupes successives :**



**c) Coupes sériées « en pointillés »**





#### **IV.1. Fixation des cerveaux par perfusion intracardiaque**

La méthode de perfusion fixatrice repose sur l'utilisation du système circulatoire de l'animal : cela permet la perfusion de l'ensemble des tissus grâce au système vasculaire naturel. Ainsi les rats sont perfusés par l'aorte, rapidement après l'anesthésie profonde car la pompe doit être mise en marche (débit : 25mL/min) sur l'animal en vie pour la qualité de fixation et du traitement immunohistochimique qui va suivre. Pour favoriser la circulation haute, l'aorte descendante est clampée: seule la partie supérieure de l'animal est soumise à la fixation (*fig.3*).

On perfuse d'abord une solution de rinçage, de NaCl/Nitrite (9g NaCl et 10g Nitrite, dans 1 L d'eau osmosée), à 37°C pour laver les vaisseaux du sang et permettre une meilleure vasodilatation des vaisseaux de façon à favoriser le passage du liquide de fixation au sein des tissus. Les rats, et en particulier leur cerveau, sont ensuite fixés par perfusion de paraformaldéhyde à 4% froid (environ 200 mL par animal).

Les cerveaux auxquels sont rattachés les bulbes olfactifs sont alors délicatement prélevés (*fig.4*) et post-fixés dans du paraformaldéhyde à 4% la nuit à 4°C puis placés dans du PBS 0,1% avec 30% de sucrose à 4°C jusqu'à imprégnation des tissus (~24h). Le sucrose sert de cryoprotecteur pour réaliser les coupes au cryostat.

#### **IV.2. Coupes histologiques (fig.5 et 6)**

Après congélation des cerveaux dans de l'isopentane entre -40 et -35°C, les coupes sériées de BO de 20 µm d'épaisseur sont réalisées au cryostat à -20°C puis montées directement sur lames de verre gélatinées. La congélation doit être rapide car elle affecte l'efficacité du montage sur lame et la qualité de conservation des tissus. Les coupes cérébrales montées sur lame sont conservées à -20°C. Dans le sens horizontal, 12 coupes successives sont faites aux extrémités dorsale et ventrale des BO. Dans les zones médianes, seule 1 coupe sur 2 a été conservée. Les marquages immunohistochimiques ont été réalisés sur des coupes dorsales et ventrales (*fig.6*).

#### **IV.3. Immunomarquages (les anticorps utilisés sont résumés dans le *tableau 2*)**

##### **IV.3.1. Protéine c-Fos : mise au point du double marquage GFAP/c-Fos**

##### **Protocole de révélation de l'anticorps anti-c-Fos par fluorescence**

Les coupes de BO sont perméabilisées et les sites antigéniques aspécifiques sont bloqués par une incubation dans du PBST (Phosphate Buffered Saline : PBS 0,1M/Triton 0,3%) BSA 5% 2h à température ambiante. Après plusieurs rinçages en PBST BSA 0,2% les lames sont

<b>Anticorps</b>	<b>Dilution</b>	<b>Incubation</b>	<b>Fournisseur</b>
Anti c-fos (Ab-5, fait chez le lapin)	1/1000	72h à 4°C	<i>Calbiochem</i> , France
Anti GFAP_Cy3	1/1000	1h à TA	<i>Sigma</i> , Saint-Quentin Fallavier, France
Anti lapin biotinylé (fait chez la chèvre)	1/400	24h à 4°C	<i>Sigma</i> , Saint-Quentin Fallavier, France
Anti lapin_Alexa488 (fait chez l'âne)	1/500	24h à TA	<i>Invitrogen</i> , Cergy Pointoise, France

**Tableau 2 : Anticorps utilisés pour l'immunohistochimie**

incubées avec l'anticorps anti-c-Fos 72h à 4°C. Puis les lames sont incubées 24h à 4°C et à l'obscurité avec l'anticorps secondaire anti-lapin Alexa-488. Enfin, les lames sont rincées au PBS puis montées sous lamelle avec du milieu de montage pour fluorescence *Dako* (France). La visualisation est possible grâce à une excitation du fluorochrome couplé à l'anticorps secondaire à la longueur d'onde de 495 nm et une émission de fluorescence verte autour de 519 nm.

### **Protocole de révélation de l'anticorps anti-c-Fos par la DAB**

L'inhibition de l'activité des peroxydases endogènes est effectuée par un traitement à l'eau oxygénée H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (5%) 1h à température ambiante. Les sites aspécifiques sont ensuite bloqués par une incubation dans du PBST additionné de 5% de sérum de chèvre 1h à température ambiante. Les lames sont incubées avec l'anticorps primaire anti-c-Fos 72h à 4°C, puis après plusieurs rinçages en PBS, avec l'anticorps secondaire anti-IgG de lapin-biotinylé 24h à 4°. Le marquage est amplifié grâce à un système de complexes macromoléculaires Avidine-Biotine (kit ABC, Vectastain, *Vectorlabs*, France) : la protéine avidine préalablement couplée à la peroxydase reconnaît et fixe les biotines de l'anticorps secondaire, puis l'ajout de diaminobenzidine (DAB) permet la révélation des sites c-Fos grâce à la production d'un composé brun. Enfin, les lames sont séchées et déshydratées dans des bains successifs d'éthanol de concentrations croissantes (30°, 70°, 90°, 100°) et de toluène, puis montées sous lamelle dans du DePex (*BDH Laboratory Supplies*, France).

### IV.3.2. GFAP

Les lames sont incubées avec l'anticorps anti-GFAP couplé à la cyanine-3, dilué au 1/1000 dans du PBST BSA 0,2% 1h à température ambiante et à l'obscurité. Après plusieurs rinçages en PBST BSA 0,2% les noyaux sont marqués par incubation dans de la bis-benzimide à 0,5µg/mL dans du PBS, 1h à température ambiante et à l'obscurité : la bis-benzimide (*Hoechst*, *Sigma*, France) se lie spécifiquement aux régions riches en bases AT de l'ADN. Enfin, les lames sont rincées au PBS puis montées entre lame et lamelle avec du milieu de montage pour fluorescence *Dako*. La visualisation de la GFAP est possible grâce au fluorochrome Cy3 couplé à l'anticorps, excitable à une longueur d'onde de 552 nm et qui émet sa fluorescence rouge autour de 570 nm.

Dans le cas d'un double marquage c-fos/GFAP, cette étape est réalisée après le marquage fluorescent de c-fos.



#### **IV.4. Acquisition des images et quantification de la GFAP**

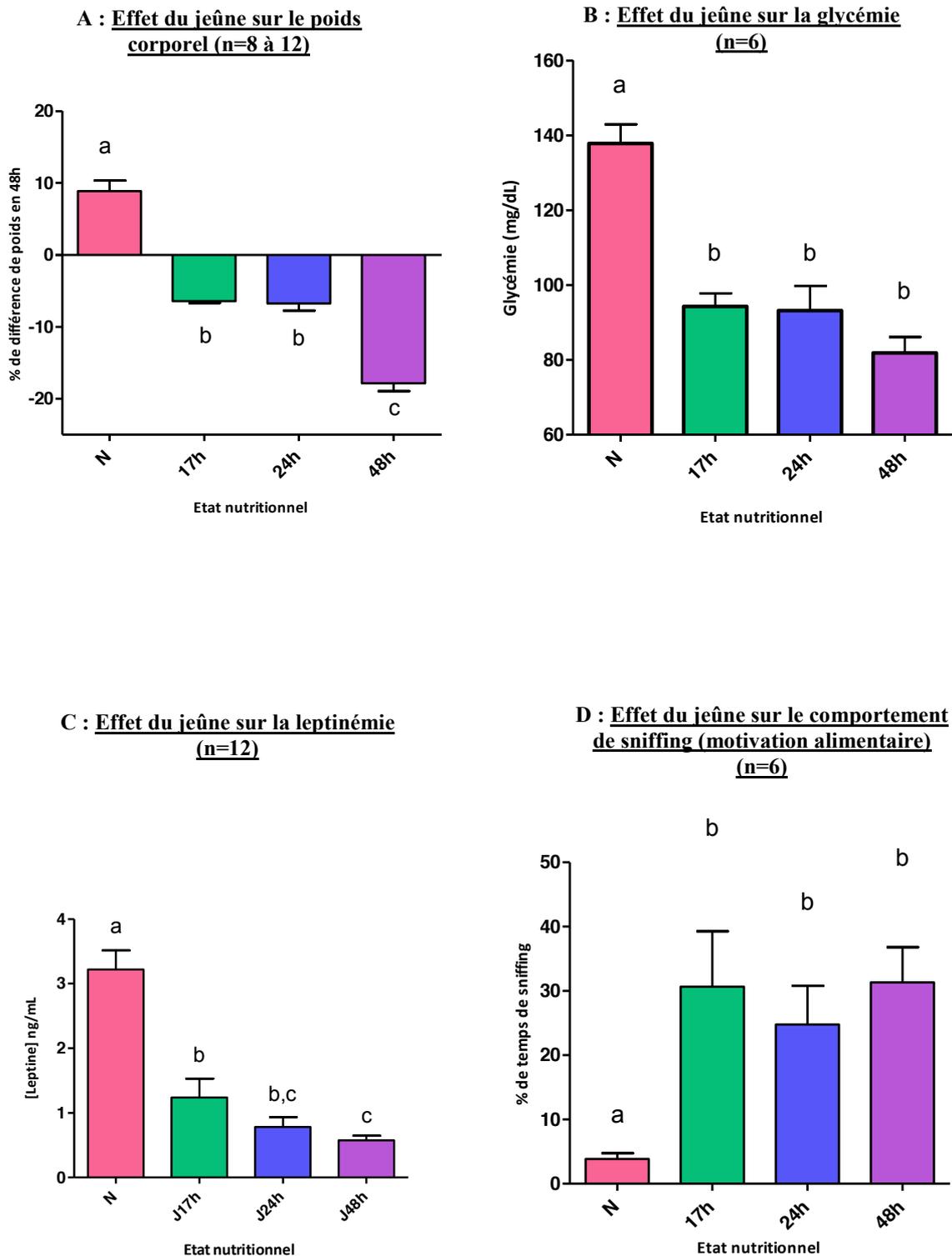
L'observation des coupes est réalisée sur un microscope à fluorescence Leica DMR équipé d'une caméra CCD couleur (Olympus DP-50) et les images sont acquises grâce au logiciel *Viewfinder*. Sur chaque coupe de BO, une dizaine de prises de vue sont réalisées à l'objectif 20X ( $10 \pm 5$  photos par coupe cérébrale ; sur environ 6 coupes par animal: 3 dans la partie dorsale et 3 dans la partie ventrale).

Les photos prises sont analysées avec le logiciel *ImageJ*. Les zones d'intérêt sont délimitées (R.O.I. *region of interest*), correspondants aux glomérules. Le déploiement astrocytaire/glomérule dans l'ensemble des glomérules étudiés est ensuite quantifié grâce à la mesure de l'aire occupée par le marquage GFAP (aire calculée pour un seuil d'intensité fixé). Voir *fig.5* pour le détail des étapes de l'acquisition et de la quantification des données. Les résultats présentés sont exprimés en moyenne  $\pm$  S.E.M. la moyenne étant calculée sur l'ensemble des mesures « **aires GFAP/glomérule** » d'un rat donné (à un niveau donné : localisation dans le bulbe olfactif, dorsale ou ventrale).

#### **V. Analyses statistiques**

Les résultats présentés sont la moyenne  $\pm$  S.E.M. Le seuil de significativité a été fixé à  $p > 0,05$ .

- Pour les paramètres physiologiques et les Western blots : test par permutation (test exact), sous le logiciel *R*.
- Pour les quantifications GFAP/glomérule (IHC) : 2-way ANOVA avec mesures appariées, sous le logiciel *Graph Pad Prism 5*.



**Figure 7 : Caractérisation physiologique et comportementale de l'état de jeûne chez les rats âgés de 5 semaines.** Les données sont représentées par la moyenne  $\pm$  S.E.M. et comparées par test par permutation ( $\mathbb{R}$ ).  $a \neq b \neq c$  :  $p < 0,05$ . N = nourris, J17h = à jeun depuis 17h, J24h = à jeun depuis 24h, J48h = à jeun depuis 48h, n=nombre de rats dans chaque groupe.

# RESULTATS

## I. Paramètres physiologiques

### **I.1. Effet du jeûne sur le poids corporel (fig. 7-A)**

Au début de l'expérimentation, nos rats Wistar de 5 semaines présentent un poids moyen de  $176,41 \pm 5,60$  g. La variation de poids observée chez les rats à jeun est significativement différente des variations de poids des rats nourris, quelle que soit la durée de jeûne (avec  $+8,9 \pm 1,45\%$  du poids corporel comme prise de poids chez les nourris, et une perte de  $-6,4 \pm 0,26$  à  $-17,9 \pm 1,11\%$  chez les animaux en situation de jeûne). On observe également une gradation de l'effet, une perte de poids significativement accrue chez les animaux en situation de jeûne prolongé (48h) par rapport à ceux de 17h et 24h.

### **I.2. Effet du jeûne sur la glycémie (fig. 7-B)**

Le groupe des rats nourris étant le groupe contrôle, on note leur glycémie moyenne de  $145 \pm 6,72$  mg/dL (mesures du matin) et  $124 \pm 3,54$  mg/dL (mesures de l'après-midi). La glycémie est significativement plus faible chez les rats à jeun, par rapport aux rats nourris, quelle que soit la durée de privation alimentaire et sans différence significative entre les différentes durées de jeûne (avec une glycémie moyenne de  $137,8 \pm 5,12$  mg/dL chez les animaux nourris et  $81,3 \pm 4,31$  à  $94,3 \pm 3,46$  mg/dL chez les animaux à jeun).

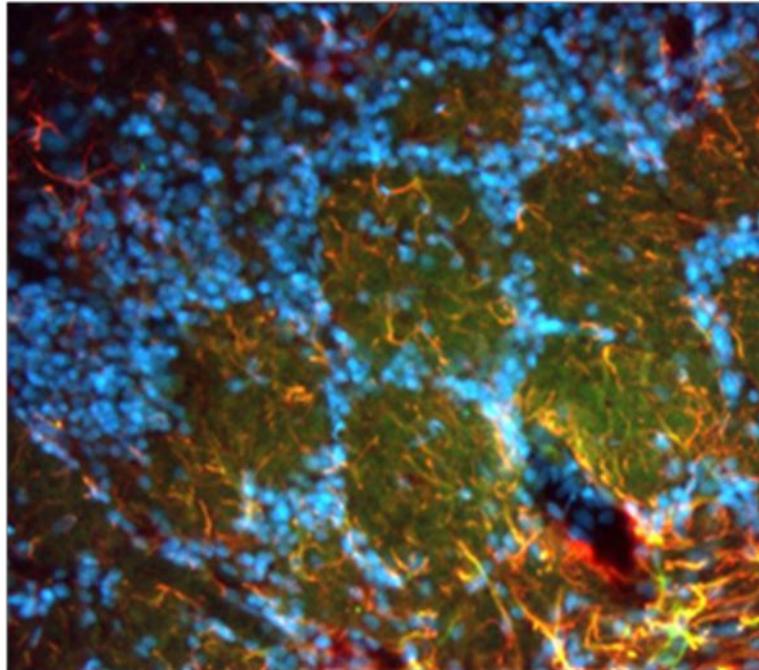
### **I.3. Effet du jeûne sur la leptinémie (fig. 7-C)**

La leptinémie est significativement diminuée chez les rats à jeun, comparativement aux rats nourris, quelle que soit la durée de privation alimentaire (avec une leptinémie moyenne de  $3,21 \pm 0,30$  ng/dL chez les animaux nourris et  $0,57 \pm 0,08$  à  $1,23 \pm 0,29$  ng/dL chez les animaux à jeun). On observe également une gradation de l'effet : la leptinémie moyenne à jeun 48h est significativement plus faible que celle à jeun 24h avec  $0,57 \pm 0,08$  ng/dL pour le jeûne de 48h et  $0,78 \pm 0,15$  ng/dL avec 24h de jeûne.

### **I.4. Effet du jeûne sur le comportement (fig. 7-D)**

La mesure du temps de reniflage dans les différentes situations nutritionnelles reflète l'ampleur de la motivation alimentaire. Le temps de reniflage observé est significativement augmenté chez les rats à jeun, par rapport aux rats nourris, quelle que soit la durée de



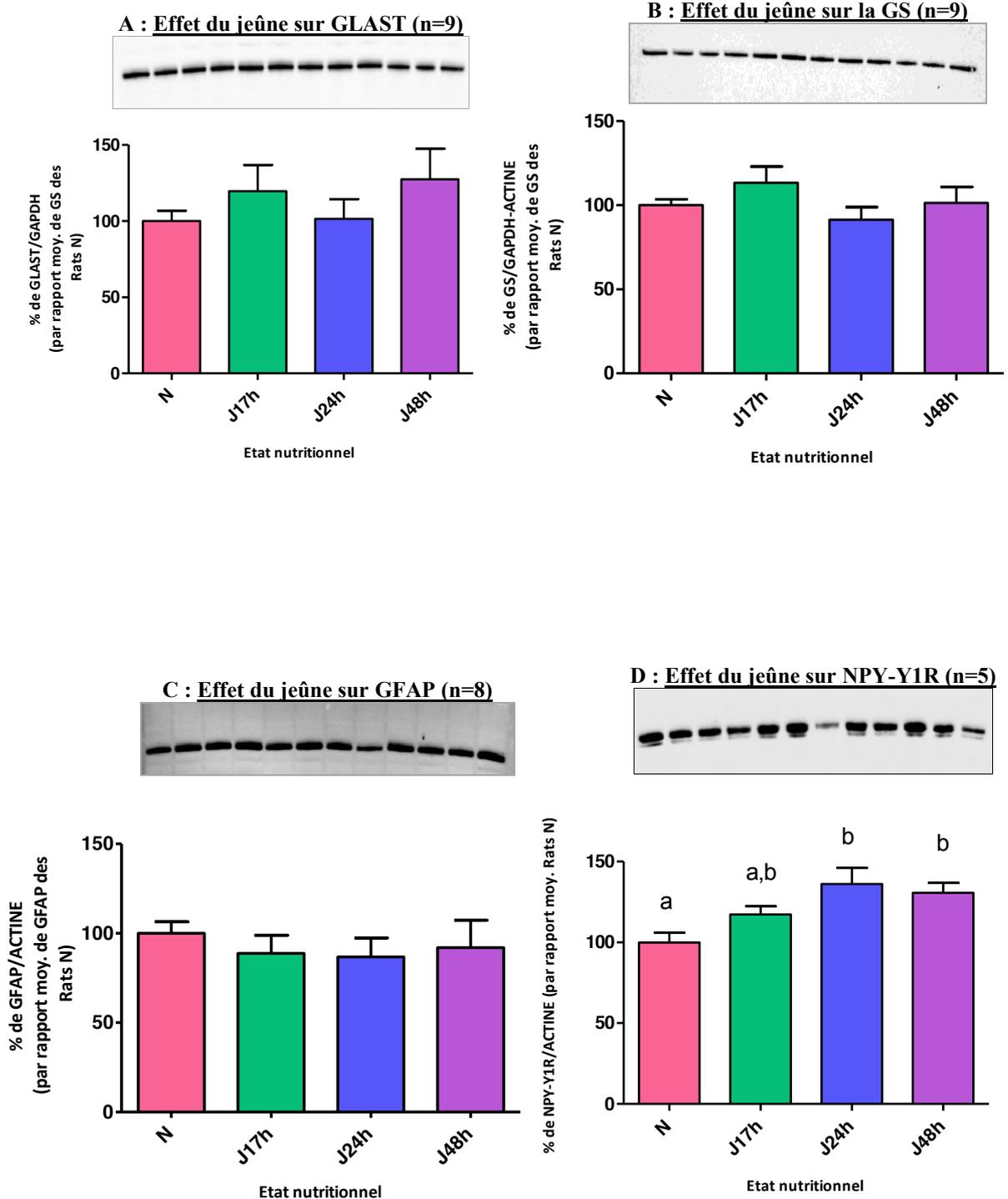


**GFAP+ récepteurs NPY** dans les glomérules

**Figure 8 : Co-localisation de NPY-Y1R et GFAP**  
**dans les glomérules olfactifs**

Marquage immunohistochimique des filaments astrocytaires (GFAP en rouge), des noyaux (*Hoechst*, en bleu) et des récepteurs NPY-Y1R (en vert). On observe une co-localisation GFAP et NPY-Y1R particulièrement au niveau des glomérules.

[tiré de travaux précédents de l'unité NBO]



**Figure 9: Expression des marqueurs astrocytaires de la synapse glutamatergique dans les BO de rats âgés de 5 semaines.** Les données sont représentées par la moyenne  $\pm$  S.E.M. et comparées par test par permutation ( $\mathbb{R}$ ).  $a \neq b \neq c$  :  $p < 0,05$ . N = nourris, J17h = à jeun depuis 17h, J24h = à jeun depuis 24h, J48h = à jeun depuis 48h, n=nombre de rats dans chaque groupe.

privation alimentaire et sans différence significative entre les différentes durées de jeûne ( $3,8 \pm 0,88$  % chez les nourris et  $24,8 \pm 6,00$  à  $31,3 \pm 5,46$  % chez les animaux à jeun).

Ainsi dès 17h de jeûne, on observe une perte de poids significative, une diminution significative de la glycémie et de la leptinémie, ainsi qu'une augmentation significative du temps de reniflage (motivation alimentaire accrue), comparativement aux rats nourris.

## **II. Western Blot**

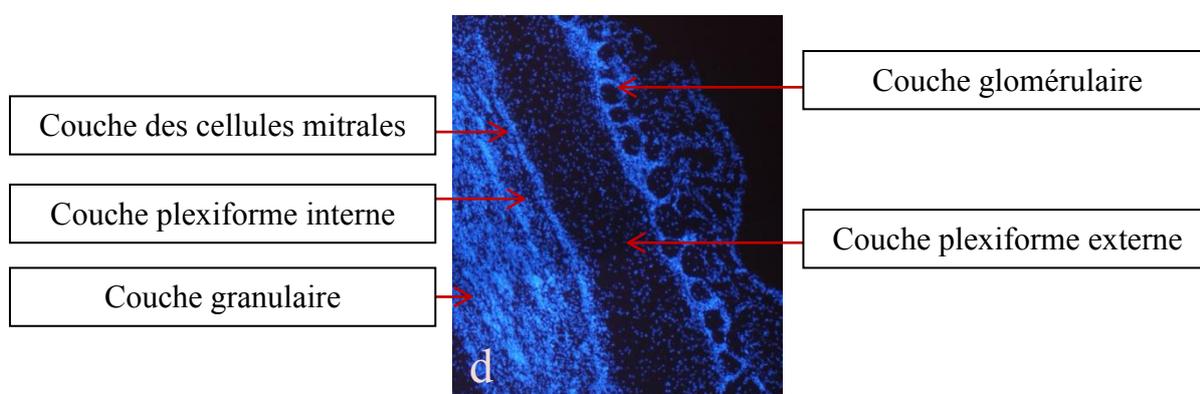
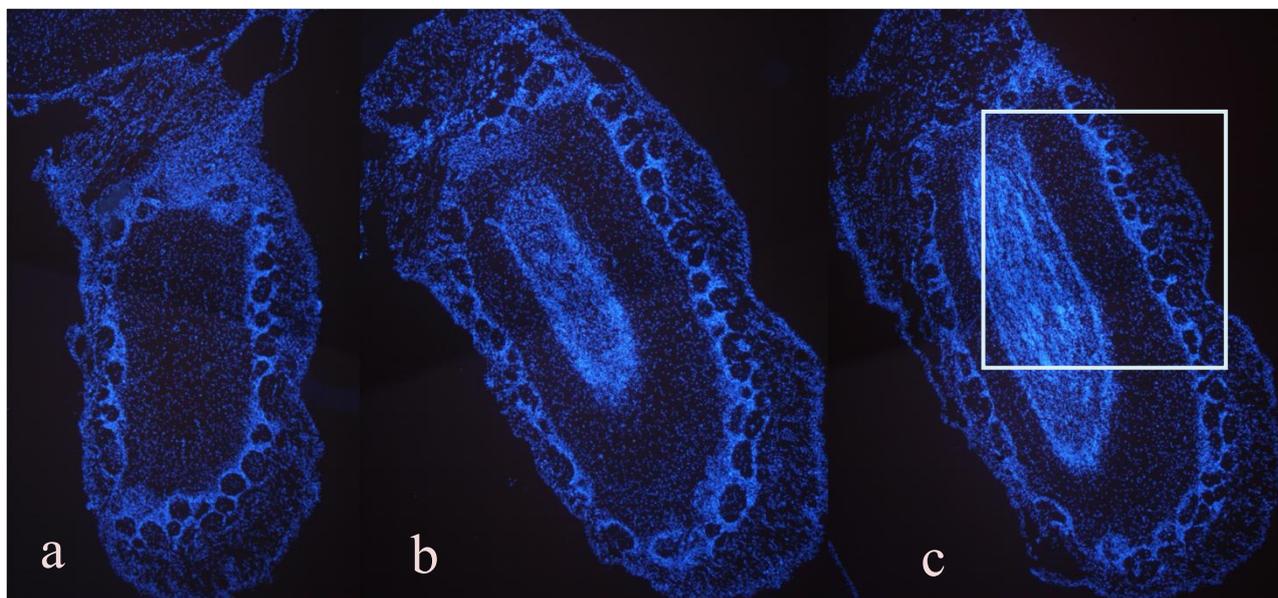
### **II.1. Effet du jeûne sur GLAST et GS (fig. 9-A et 9-B)**

GLAST (Glutamate-Aspartate Transporter) est un transporteur astrocytaire du glutamate et GS (Glutamine Synthase), une enzyme ayant pour substrat le glutamate pour synthétiser la glutamine : tous deux permettent la régulation des concentrations extracellulaires de glutamate et participent donc à la neurotransmission glutamatergique dans le BO. On n'observe pas de différence significative pour l'expression de GLAST et de GS entre les différents modèles de mise à jeun, comparativement aux animaux nourris.

### **II.2. Effet du jeûne sur GFAP et NPY-Y1R (fig. 9-C et 9-D)**

La GFAP (protéine acide des gliofilaments astrocytaires) est un marqueur des filaments astrocytaires dans le BO. La quantité de GFAP n'est pas différente significativement entre les différents groupes de rats à jeun, toujours par rapport au groupe des nourris.

Dans le BO, le récepteur Y1R du facteur orexigène NPY (NPY-Y1R) est essentiellement présent sur les astrocytes (résultats observés dans des travaux précédents *fig.8*). L'expression de NPY-Y1R est significativement plus élevée chez les groupes à jeun 24h et 48h ( $136,2 \pm 9,91$  % et  $130,7 \pm 6,09$  % des nourris) par rapport aux animaux nourris ; mais sans différence significative entre les nourris et les animaux à jeun 17h ( $117,3 \pm 5,10$  %) et sans différence significative entre les 3 groupes d'animaux à jeun.



**Figure 10 : photos (objectif 5X) de coupes dorsales de BO de rat**

Les 3 coupes de la partie dorsale du BO ci-dessus sont reconstituées à partir de photos réalisées à l'objectif 5X. Le marquage Hoechst permet la visualisation des noyaux délimitant les glomérules, ceux-ci sont alignés en une couche circulaire. Dans les photos successives **a** à **c**, chaque coupe est séparée de la suivante par 80  $\mu\text{m}$  : en **a**, on ne voit que la couche glomérulaire et la couche plexiforme au centre du BO ; à mesure que l'on « avance » dorso-ventralement, la couche des cellules granulaires apparaît et s'agrandit ; en **c**, on distingue la couche des cellules mitrales.

En **d** : zoom sur la photo **c**, on distingue les couches granulaire, plexiforme interne, mitrale et plexiforme externe et glomérulaire.

### **III. Immunohistochimie sur coupes cérébrales :**

#### **Effet du jeûne sur le déploiement astrocytaire**

##### **III.1. Observation qualitative**

Le marquage Hoechst des noyaux réalisé sur des coupes horizontales de BO nous permet de distinguer les différentes couches cellulaires caractéristiques du BO, avec en particulier la couche glomérulaire, les glomérules étant caractérisés par une absence de marquage au centre et des noyaux marqués en périphérie. L'analyse quantitative du déploiement astrocytaire portera sur chacun des glomérules distingués au sein d'une coupe (*fig.10*).

A l'objectif 20X, on peut analyser qualitativement le déploiement astrocytaire (GFAP, en rouge) au sein des glomérules (délimités par les noyaux marqués des neurones périglomérulaires et des astrocytes, en Hoechst, en bleu, *fig.11 et 12*).

##### **Compartimentation et orientation dans les glomérules**

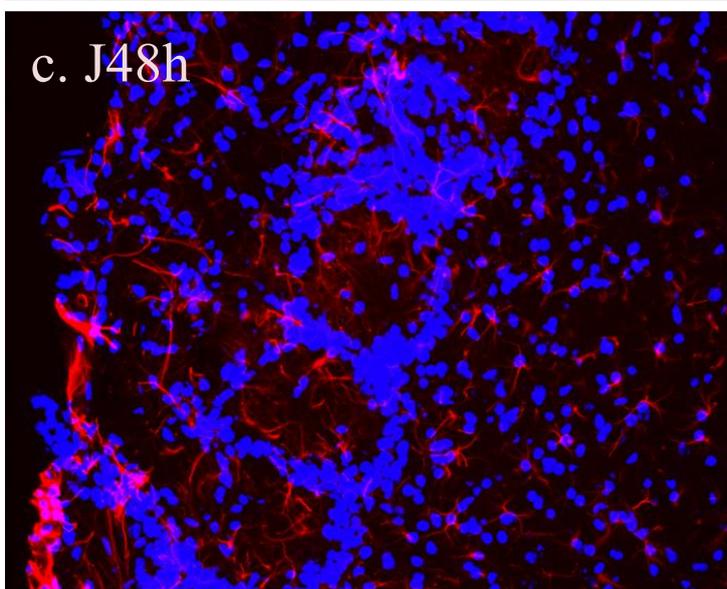
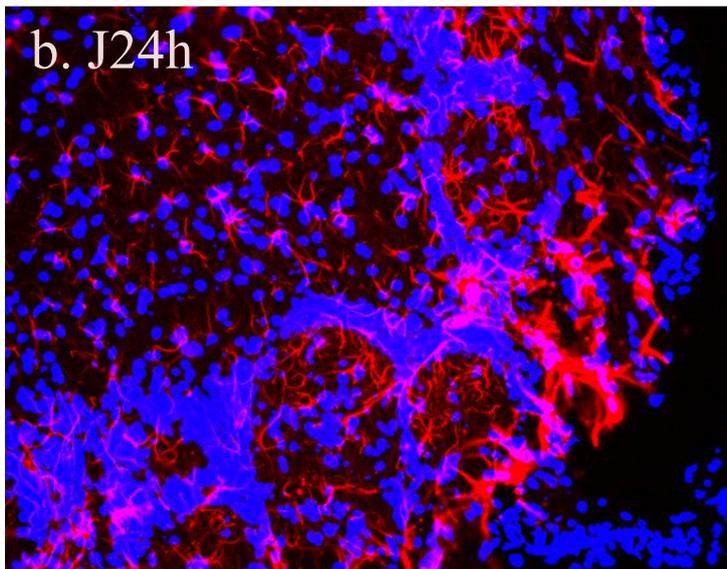
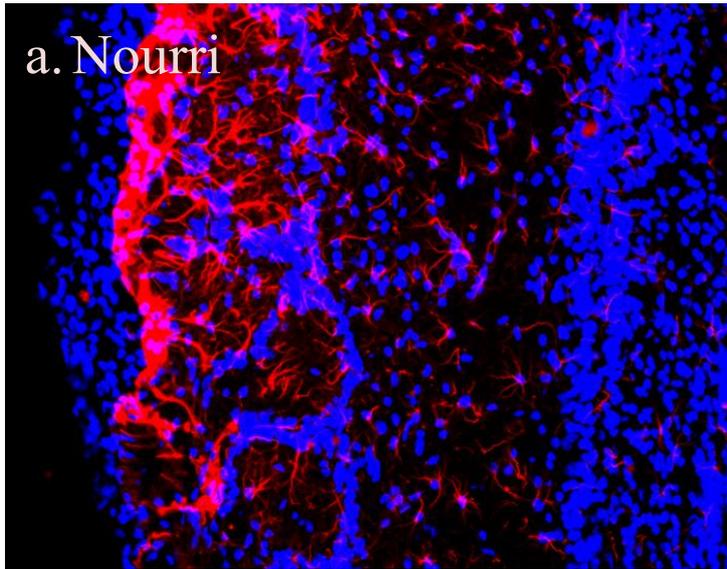
L'ensemble des photos analysées et en particulier celles présentées ici (*fig. 11 et 12*) montre une organisation fine des prolongements astrocytaires dans les glomérules du BO. En effet, alors que dans la couche plexiforme externe, l'arrangement spatial des astrocytes apparaît uniforme sans axe particulier (*fig.11-c et 12-b* par exemple), les astrocytes dans les glomérules présentent une répartition particulière :

- 1) Le marquage GFAP des astrocytes semble plus dense à l'intérieur des glomérules ;
- 2) Les astrocytes d'un glomérule donné s'alignent sur sa périphérie et envoient leurs prolongements fins vers le centre du glomérule (ex : *fig.11-c*) ;
- 3) Les filaments astrocytaires au sein des glomérules présentent une certaine orientation : de l'extérieur vers l'intérieur du BO (centripète), suivant le trajet des fibres neuronales principales (axe des connexions établies entre neurones olfactifs et cellules mitrales) (ex : *figures 11-a et 12-a*).

##### **Variation selon l'état nutritionnel**

Dans les coupes dorsales, les filaments astrocytaires semblent moins marqués et déployés vers le centre des glomérules chez l'animal à jeun 48h (*fig.11-c*) qu'en situation de satiété (*fig.11-a*). Dans les coupes ventrales, il est plus difficile d'observer une variation selon l'état de jeûne-satiété : le déploiement astrocytaire est important et uniforme quelle que soit la condition (*fig. 12-a, 12-b, 12-c*).

**Figure 11 : Marquage GFAP/Hoechst des glomérules dorsaux**

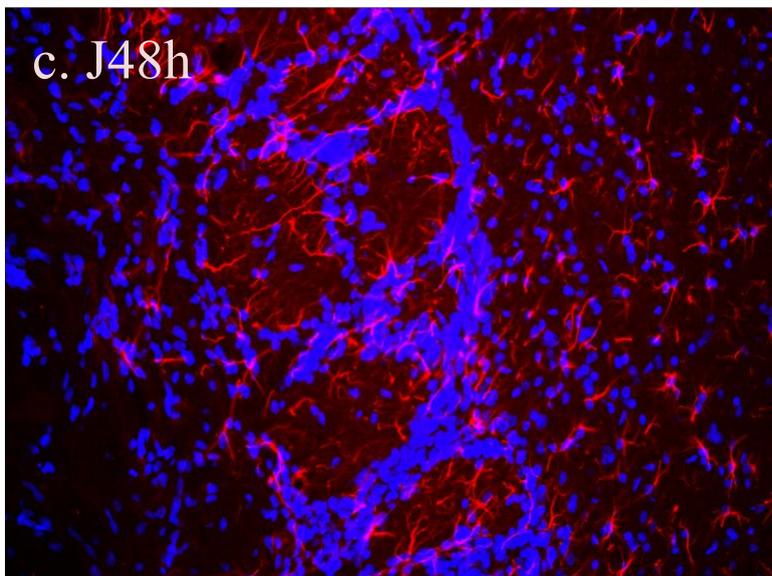
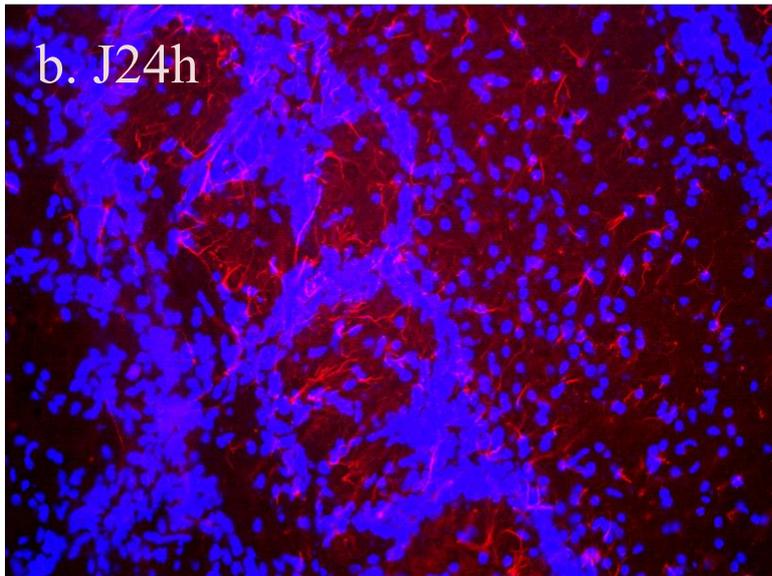
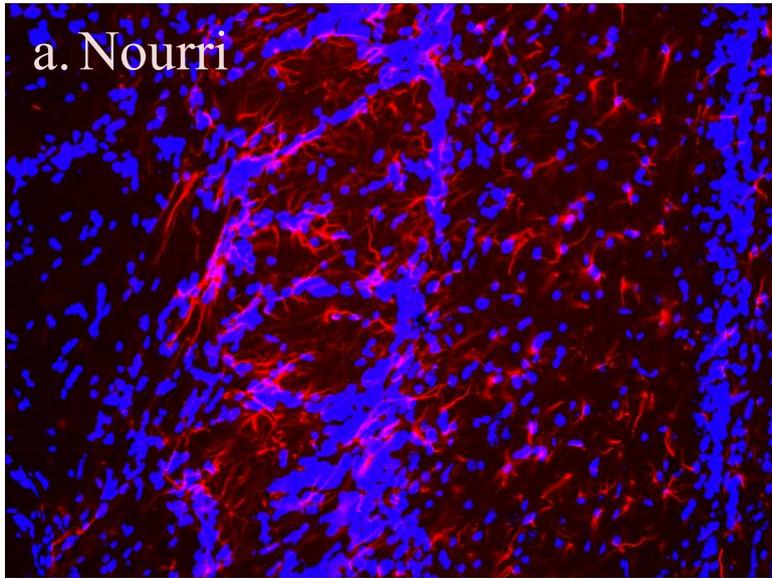


*Objectif 20X*

**11-a** : Partie du BO gauche d'un rat nourri ; **11-b** : Partie du BO gauche d'un rat à jeun 24h ; **11-c** : Partie du BO gauche d'un rat à jeun 48h.

Le marquage en bleu (Hoechst) des noyaux permet la distinction des glomérules et le marquage rouge (GFAP) reflète la présence et le déploiement des prolongements astrocytaires.

**Figure 12 : Marquage GFAP/Hoechst des glomérules ventraux**

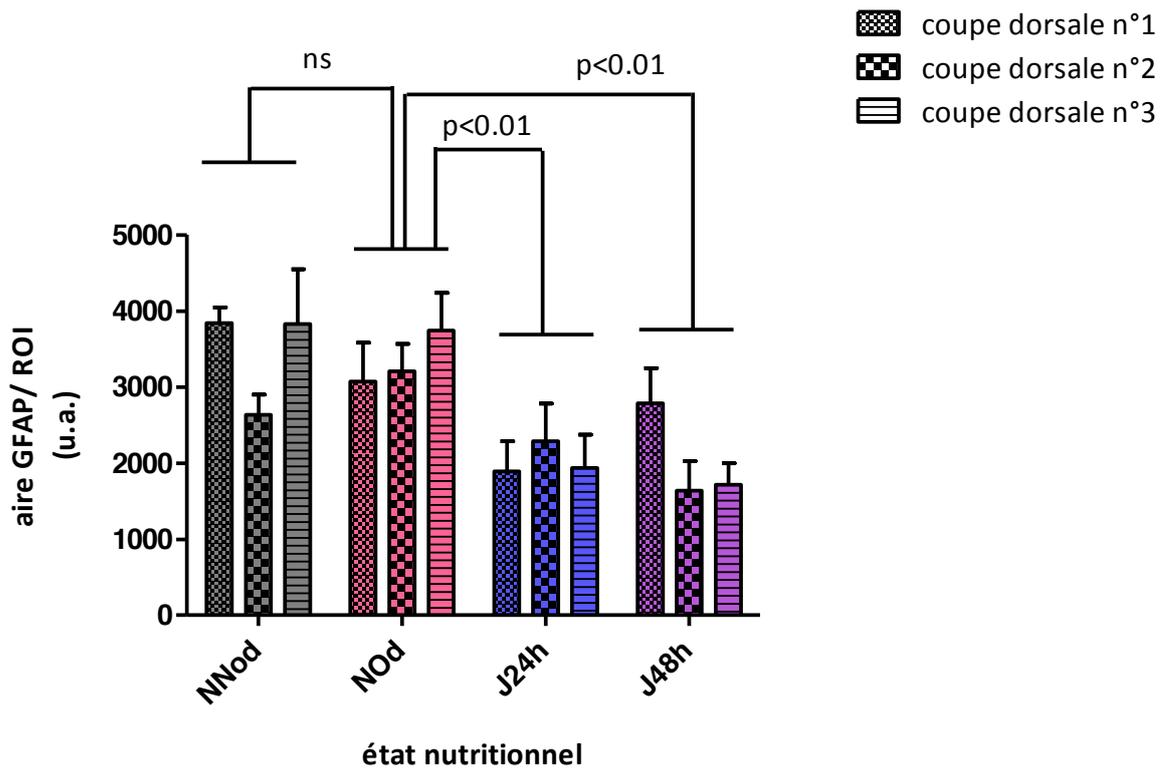


*Objectif 20X*

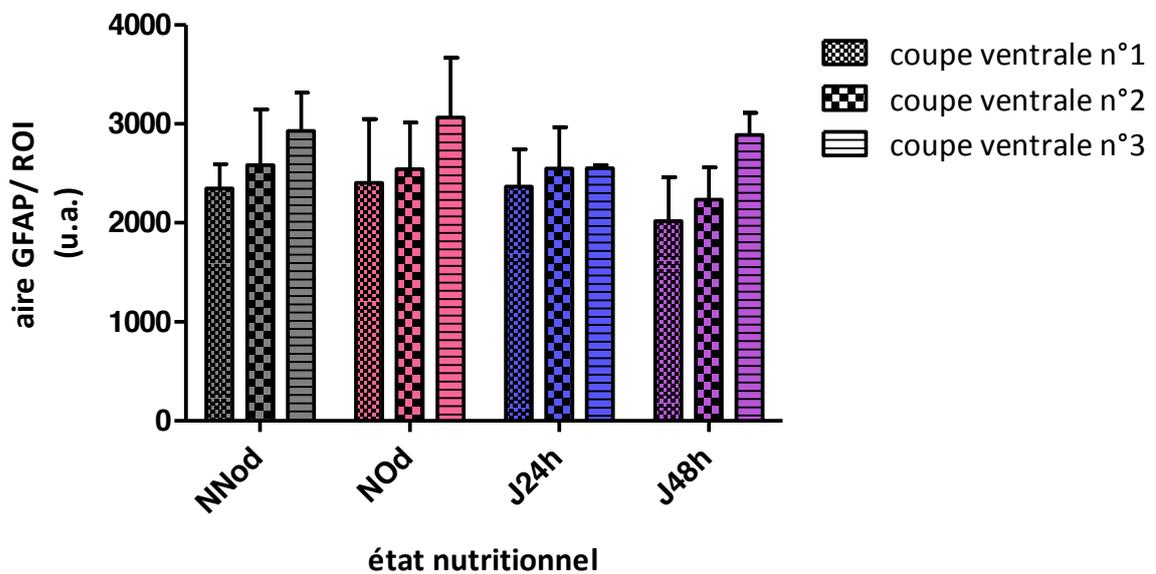
**12-a** : Partie du BO gauche d'un rat nourri ; **12-b** : Partie du BO gauche d'un rat à jeun 24h ; **12-c** : Partie du BO gauche d'un rat à jeun 48h.

Le marquage en bleu (Hoechst) des noyaux permet la distinction des glomérules et le marquage rouge (GFAP) reflète la présence et le déploiement des prolongements astrocytaires.

**A : Effet du jeûne sur le déploiement astrocytaire des glomérules dorsaux**



**B : Effet du jeûne sur le déploiement astrocytaire des glomérules ventraux**



**Figure 13 : Effet du jeûne sur le déploiement astrocytaire des glomérules de BO de rats de 5 semaines.** Les histogrammes représentent les moyennes  $\pm$  S.E.M. des aires GFAP/glomérule sur n=4 rats par condition et par coupe analysée. NNod = Nourri non soumis au protocole d'odorisation ; NOd = nourri soumis au protocole d'odorisation ; J24h = à jeun 24h soumis au protocole d'odorisation ; J48h = à jeun 48h soumis au protocole d'odorisation.

### **III.2. Analyse quantitative : effet du jeûne sur l'aire GFAP/glomérule**

#### **Effet du jeûne sur le déploiement des filaments astrocytaires (*fig.13*)**

Les BO étudiés sont issus d'animaux soumis à un protocole d'odorisation réalisé dans le but d'obtenir un marquage de l'activation neuronale (c-fos) et d'observer un lien entre le déploiement astrocytaire et l'activation glomérulaire. Cependant le marquage final c-fos n'étant pas satisfaisant, nous ne discuterons uniquement des résultats sur le déploiement des filaments astrocytaires en fonction de l'état nutritionnel.

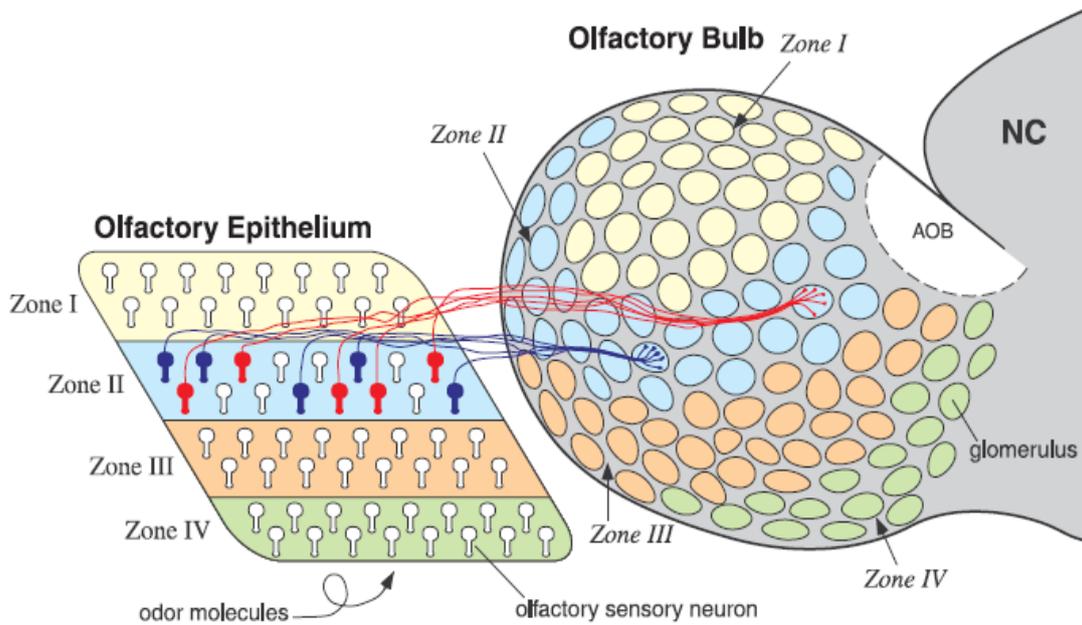
L'amplitude du déploiement astrocytaire a été quantifiée par la mesure de l'aire de marquage GFAP/glomérule (marquage immunohistochimique selon le protocole décrit en IV.3.2.). Le BO n'est pas une structure homogène, en effet on connaît une certaine régionalisation en plusieurs zones distinctes selon un axe dorso-ventral, impliquant certainement des régulations propres à chaque zone (*fig.14*). C'est pour cette raison que nous avons séparé et quantifié les aires GFAP/glomérule de chaque coupe (les 3 coupes d'une lame donnée). La comparaison entre les groupes est réalisée sur des coupes équivalentes dans leur positionnement dorso-ventral dans le BO.

Dans les glomérules dorsaux, le déploiement astrocytaire diminue avec le jeûne : les déploiements moyens (GFAP/glomérule) des groupes à jeun 24h et à jeun 48h sont chacun significativement plus faibles que les nourris avec  $p < 0,01$  (GFAP/glomérule des nourris odorisés, NOd,  $\sim 3500$  u.a.; des rats à jeun 24h et 48h  $\sim 2000$  u.a. *fig.13*). En revanche, le déploiement astrocytaire ne varie pas selon la zone du BO où la coupe est réalisée (effet « coupe » et interaction coupe\*état nutritionnel non significatifs). Enfin le déploiement astrocytaire ne varie pas selon que le groupe est soumis à l'odorisation ou non : pas de différence significative de l'aire moyenne GFAP/glomérule entre les animaux nourris non odorisés et les animaux nourris odorisés (NNod et NOd, *fig.13-A*).

On n'observe pas d'effet du jeûne sur le déploiement astrocytaire des glomérules ventraux (effet du jeûne et interaction coupe\*état nutritionnel non significatifs, *fig.13-B*). On note cependant que le déploiement astrocytaire varie selon la zone du BO où la coupe a été réalisée (effet « coupe » significatif), avec des aires de déploiement astrocytaire croissant des coupes n°1 (plus dorsalement) vers les coupes n°3 (plus ventralement), quelle que soit la condition nutritionnelle.

#### **Effet du jeûne sur la taille des glomérules du BO (*fig.15*)**

On n'observe pas d'effet significatif du jeûne ou de la position (coupe) sur les tailles des glomérules du BO, aussi bien en position ventrale qu'en position dorsale.

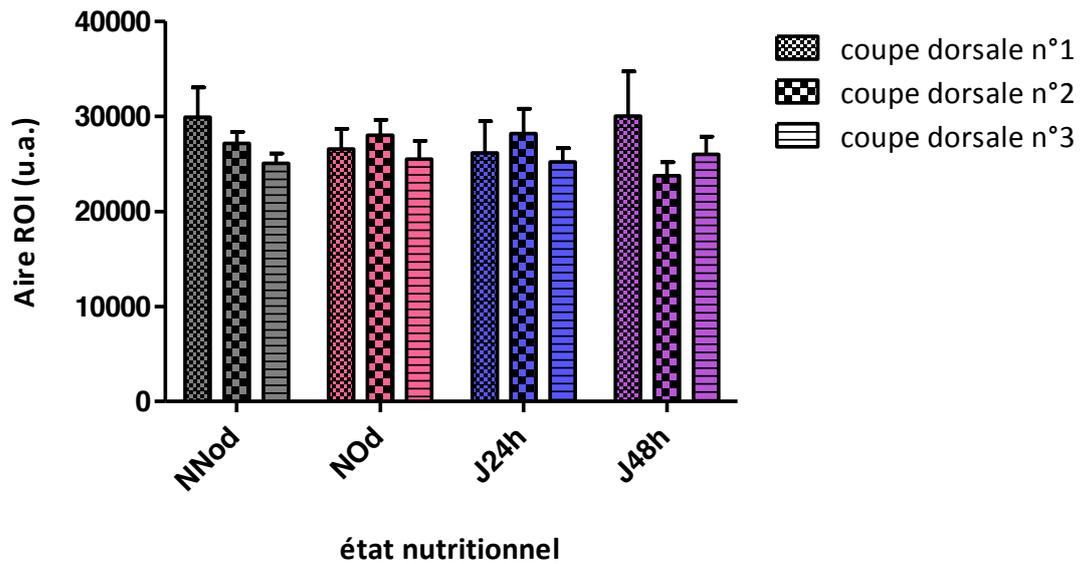


**Figure 14 : Schéma de l'organisation des récepteurs et glomérules olfactifs**

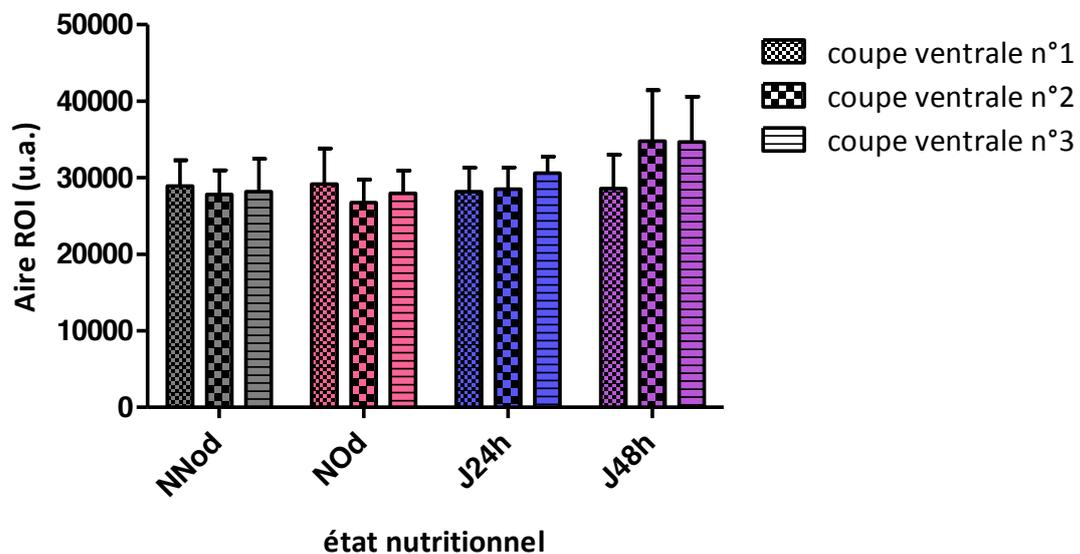
Schéma illustrant la connectivité entre l'épithélium et le bulbe olfactifs : l'épithélium est divisé en 4 zones (zone I à IV) définies par l'expression des récepteurs olfactifs. Les NSO d'une zone donnée de l'épithélium projettent sur les glomérules d'une zone correspondante (*zones I à IV, en italique*) du BO. Les axones des NSO exprimant un même récepteur olfactif (rouge ou bleu) convergent vers un ensemble restreint de glomérules. NC : néo-cortex ; AOB : Bulbe olfactif accessoire.

[tiré de Mori *et al.* (1999)]

### A : Effet du jeûne sur la taille des glomérules dorsaux



### B : Effet du jeûne sur la taille des glomérules ventraux



**Figure 15 : Effet du jeûne sur la taille des glomérules du BO de rats de 5 semaines.** Les histogrammes représentent les moyennes  $\pm$  S.E.M. des aires des glomérules sur n=4 rats par condition et par coupe analysée. NNod : Nourri non soumis au protocole d'odorisation ; NOd : nourri soumis au protocole d'odorisation ; J24h : à jeun 24h soumis au protocole d'odorisation ; J48h : à jeun 48h soumis au protocole d'odorisation.



## DISCUSSION

Le choix alimentaire s'inscrit dans un contexte sensoriel global en interaction avec la situation nutritionnelle et influencé par la mémoire ainsi que la sensation anticipée de plaisir ou de dégoût. Dans notre étude, nous avons cherché à préciser les mécanismes qui sous-tendent l'adaptation de la sensibilité olfactive à l'état nourri/à jeun. Le bulbe olfactif, traitant des stimuli olfactifs et situé entre la muqueuse olfactive et le système nerveux central, est l'un des premiers sites d'adaptations à l'état métabolique (expression de nombreux peptides et hormones de la prise alimentaire et de leurs récepteurs, dans le BO [1]). Nous savons par ailleurs que le BO contient des réseaux astrocytaires abondants, et connaissant le rôle régulateur des astrocytes via des mécanismes de plasticité morphologique dans d'autres régions cérébrales, notre hypothèse pour expliquer le lien entre la sensibilité olfactive et l'état nourri/à jeun est que la plasticité astrocytaire participe à la modulation de la neurotransmission glutamatergique dans le BO.

Nous commencerons par discuter nos résultats sur les effets comparés des trois durées de mise à jeun sur l'état physiologique des animaux, les marqueurs métaboliques circulants, et le comportement olfactif ; puis nous analyserons les modifications astrocytaires (déploiement et marqueurs) observées dans le BO en relation avec la synapse glutamatergique entre neurones olfactifs et cellules mitrales au niveau des glomérules.

### **MODELE de JEÛNE-SATIÉTÉ**

Nous avons d'abord caractérisé l'impact de différentes durées de mise à jeun (17h, 24h et 48h) sur la physiologie générale des animaux (âgés de 5 semaines) afin de pouvoir associer, dans la suite de notre étude, les modifications éventuelles de la présence astrocytaire à un stade de jeûne modéré ou prolongé.

Dès 17h de jeûne, nous observons une perte de poids significative (-6,4%), une baisse de la glycémie (-61%) et de la leptinémie (-32%) ainsi qu'une augmentation (temps multiplié par 10 environ) du comportement de « reniflage » (indice de l'intérêt de l'animal pour la recherche de nourriture) significatives, comparativement aux animaux nourris. On connaît les effets physiologiques du jeûne chez le rat. Au début de la privation alimentaire, pour maintenir l'homéostasie énergétique, l'organisme va puiser dans les réserves glucidiques. Au début du jeûne, la perte de poids correspond essentiellement à l'émission des selles et à l'utilisation des réserves glucidiques. A mesure que le jeûne se prolonge, l'organisme va



puiser dans différentes réserves énergétiques à disposition et des boucles de régulations métaboliques et hormonales sont déclenchées dans les heures suivant le dernier repas [18, 19] : après épuisement des réserves glucidiques (glycogénolyse hépatique), les réserves lipidiques sont mobilisées (lipolyse et production d'acides gras non estérifiés), puis la transformation des acides gras et oxydation des corps cétoniques peuvent être déclenchées et, en dernier recours, la néoglucogenèse fournit du glucose à partir des acides aminés provenant des protéines musculaires (à ce moment-là, on observe une perte soudaine et critique de la masse corporelle).

Bien que nourris *ad libitum*, les rats Wistar présentent une phase de repos de 12h (12h lumière/12h obscurité) pendant laquelle ils se nourrissent peu ou pas. Nos résultats montrent une perte de poids de -6% pour les animaux à jeun pendant 17h et 24h (résultats similaires pour les 2 stades de jeûne) correspondant à une perte de poids modérée (la limite maximale de sévérité étant fixée à -25% de perte de poids pour le rat [20]). En revanche, les animaux à jeun depuis 48h présentent une perte de poids plus importante avec -17,9% du poids initial, ce qui peut représenter jusqu'à 30g de masse corporelle (pour un rat de 170g comme ceux de notre étude). Lors du jeûne de 48h, on a noté chez les rats Wistar âgés de 10 semaines une réduction de masse corporelle de -15% et chez ceux âgés de 5 mois de -13% [21, 22], montrant ainsi des pertes de poids qui tendent à diminuer avec l'âge, du fait de la croissance corporelle et du renforcement des masses grasses et musculaires au cours du temps. Pour nos rats âgés de 5 semaines, la perte que nous observons est donc plus élevée que les valeurs reportées dans la littérature avec des rats plus âgés, et proche des critères de sévérité.

La quantité de glucose plasmatique est le reflet direct du dernier apport calorique et de l'état métabolique. La plupart des mesures de glycémie ont été réalisées l'après-midi, pendant la phase d'inactivité des rats. Ainsi la glycémie moyenne des rats nourris de  $137,8 \pm 1,4$  mg/dL correspond à la glycémie de leur phase physiologique de repos marqué par un apport calorique réduit. Cette valeur reste proche des valeurs normales habituellement observées à jeun chez le rat Wistar ([85-132 mg/dL] selon l'âge et la masse corporelle [23]) et par ailleurs, des mesures de glycémie réalisées le matin (peu après la phase d'activité) sont plus élevées (145 mg/dL le matin et 124 mg/dL l'après-midi), montrant ainsi la baisse quotidienne de la glycémie, selon le rythme circadien. En situation de jeûne, comme attendu, les glycémies moyennes sont toutes significativement plus faibles que celle des animaux rassasiés mais se maintiennent autour de 80-90 mg/dL pour les 3 durées de jeûne, montrant ainsi que la régulation de l'homéostasie glucidique s'installe dès 17h de privation alimentaire et reste efficace 48h après.



La leptine, hormone anorexigène sécrétée par les adipocytes, a pour rôle d'informer les centres nerveux de l'état de suffisance énergétique dans lequel l'organisme se trouve afin d'inhiber la prise alimentaire. Elle est présente dans le plasma en quantités proportionnelles à la masse grasse [18]. Ainsi la leptinémie est à la fois un bon indicateur de l'état des réserves corporelles (adiposité) et des variations de l'état métabolique. Dans nos résultats, l'effet du jeûne observé est graduel : lorsque la durée de jeûne augmente, la leptinémie baisse de façon significative, passant de  $0,78 \pm 0,15$  ng/dL après 24h de jeûne à  $0,57 \pm 0,08$  ng/dL après 48h de jeûne. La leptinémie est similaire pour des durées de jeûne de 17h et de 24h. Ces valeurs sont en accord avec les valeurs trouvées par ailleurs de  $0,55 \pm 0,18$  ng/mL pour des rats Wistar de 4 semaines (mesures en phase de repos, pendant laquelle la prise alimentaire est réduite, [24]). La baisse de la leptinémie dès 17h indique le déclenchement d'une régulation visant à lever l'inhibition des signaux orexigènes exercée par la leptine en situation de satiété, afin de promouvoir le déclenchement de la prise alimentaire [18]. En accord avec la corrélation leptinémie/poids corporel, on note la concordance de la leptinémie la plus faible avec la perte de poids la plus forte, chez les rats à jeun depuis 48h. Ceci montre très probablement un autre « tournant » important dans la régulation de l'homéostasie énergétique lors du jeûne prolongé, avec l'utilisation des réserves lipidiques (induisant la baisse de leptine sécrétée) puis des réserves protéiques (induisant la perte encore plus importante de poids corporel).

L'étude comportementale a quantifié le temps passé à renifler une boule à thé remplie de croquettes alimentaires, après 3h d'habituation sans odeurs alimentaires. Cette analyse montre une motivation alimentaire significativement accrue chez les animaux à jeun, 25-30% du temps total pour les 3 durées de jeûne, par rapport à des animaux nourris peu intéressés par la présence d'odeur alimentaire (4% du temps total). Le temps passé à renifler la boule à thé est un paramètre global intégrant plusieurs types de comportement et influencé par des critères autres que la seule avidité pour l'aliment : curiosité et excitation associées à une sensation de faim moyenne ou fatigue, et abattement associés à la faiblesse métabolique. L'activité de reniflage accrue des rats à jeun depuis 17h nous a semblée dynamique et ludique, alors que le comportement des animaux à jeun 24h et 48h excluait le jeu et montrait une très forte motivation à se nourrir. Ainsi les durées de reniflage similaires pour les 3 groupes de jeûne ne reflètent pas une sensation de faim et un comportement de recherche alimentaire identiques. Des tests plus élaborés seraient nécessaires pour distinguer une réelle différence de sensibilité olfactive en lien avec la recherche de nourriture en fonction des différentes durées de jeûne.



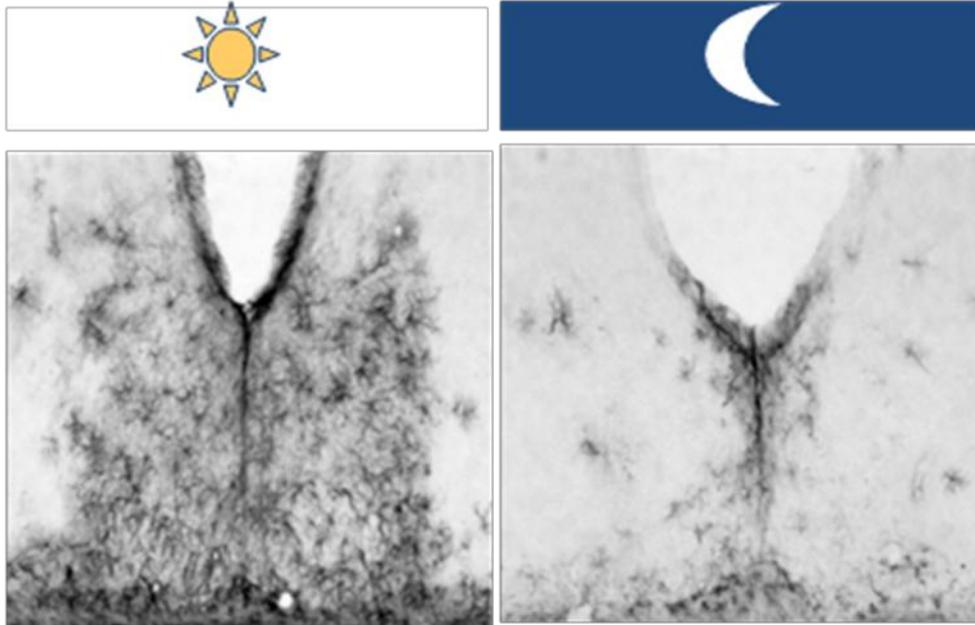
Au-delà de 24h de jeûne, pour la plupart des espèces, l'organisme enclenche des mécanismes d'adaptation pour épargner, sauver de l'énergie caractérisant le passage vers un état considéré plus critique/pathologique [25]. Dans cette situation, l'organisme peut entrer en état de stress, caractérisé par l'activation de l'axe corticotrope et l'augmentation de la corticostérone plasmatique. La durée de jeûne induisant un stress est variable selon les modèles: Zmiec *et al.* (2006) évoquent l'absence d'augmentation de la corticostérone lors d'un jeûne de 24h chez le rat Wistar de 20 mois (mais le rat âgé est à priori plus résistant au jeûne que nos rats de 5 semaines), alors que Nowland *et al.* (2011) ont montré une augmentation significative de corticostérone après 24h de jeûne chez des rats Sprague-Dawley [21, 26].

Nos données montrent des différences de statuts hormonal et pondéral indiquant une situation métabolique bien distincte entre le jeûne de 17h ou de 24h et celui de 48h :

1/ le jeûne de 17h est caractérisé par une perte de poids relativement modeste (-6% du poids initial), une glycémie et une leptinémie significativement diminuées ainsi qu'une motivation alimentaire augmentée. Ces modifications physiologiques et comportementales permettent à l'organisme de s'adapter à une privation alimentaire d'une durée proche de celle à laquelle les rats se soumettent quotidiennement pendant leur phase diurne (phase d'inactivité). Nos analyses du BO sur ce modèle permettront de savoir si une régulation astrocytaire existe déjà à ce stade pour stimuler la sensibilité olfactive lors d'un jeûne physiologique.

2/ le jeûne de 24h ne se distingue pas de celui de 17h au niveau des paramètres que nous avons mesuré : on n'observe pas d'aggravation de la réaction de l'organisme au jeûne.

3/ le jeûne de 48h ne se distingue pas de celui de 24h au niveau de la glycémie et de la motivation alimentaire, mais induit une perte de poids et une diminution de la leptinémie beaucoup plus fortes que les jeûnes de 17h et 24h. A ce stade avancé de la privation alimentaire, l'organisme enclenche très probablement d'autres mécanismes pour gérer le déficit calorique. Pour maintenir l'homéostasie énergétique, après avoir épuisé le glycogène hépatique, et au-delà de 75% de la perte des réserves lipidiques, on bascule dans l'utilisation de substrats d'acides aminés provenant des protéines musculaires. La part de protéines mobilisée pour subvenir aux besoins énergétiques augmente alors au détriment d'une synthèse protéique qui est nettement réduite (perte de poids importante). Ce modèle se distingue du



**Figure 16 : Plasticité morphologique astrocytaire observés dans les noyaux supra-chiasmatique [10]**

Chez le hamster, dans le noyau supra-chiasmatique (horloge circadienne), les astrocytes (marquage immunohistochimique GFAP) se déploient en réaction à l'information lumineuse ; la nuit, les filaments astrocytaires se rétractent.

[tiré de SERVIERE J et LAVIALLE M. *Progress in Brain Research*, 1996]

jeûne physiologique et se situe dans une perspective d'étude d'un jeûne pathologique devenu critique pour la survie de l'animal.

### **PLASTICITÉ MORPHOLOGIQUE ASTROCYTAIRE des glomérules olfactifs**

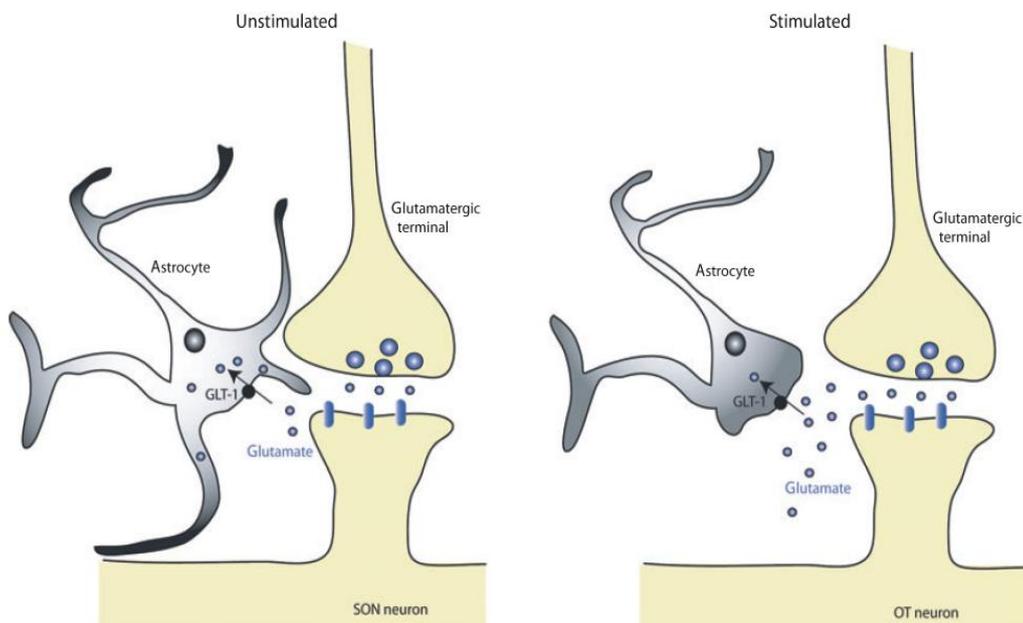
La quantification par localisation immunohistochimique de la GFAP (protéine acide des gliofilaments astrocytaires) nous a permis d'étudier le déploiement des filaments astrocytaires au sein des glomérules olfactifs (l'aire GFAP/glomérule) dans les différentes conditions expérimentales. D'après les premiers résultats obtenus, la neuromodulation portée par les astrocytes, via des mécanismes de plasticité morphologique, semble se manifester à deux niveaux différents :

#### **1/ *Compartimentation des réseaux astrocytaires dans l'organisation glomérulaire***

Les axones des NSO (neurones sensoriels olfactifs) présentent une organisation particulière, aussi bien au niveau de la muqueuse olfactive qu'au niveau du BO où ils convergent vers les glomérules. La fonctionnalité des glomérules olfactifs s'exprime à partir de « cartes » d'activité glomérulaire en lien avec une stimulation olfactive donnée : une odeur donnée active un ensemble de glomérules bien précis (*fig.14*) [27, 28]. En ce qui concerne notre objet d'étude, quel que soit l'état nutritionnel, on observe l'organisation fine et régulière des réseaux astrocytaires dans les différentes couches du BO, surtout au niveau de la couche glomérulaire et aussi bien dans la partie dorsale que dans la partie ventrale du BO. En concordance avec les résultats de Roux *et al.* (2011), on observe une orientation importante des prolongements astrocytaires vers le centre des glomérules, leurs corps cellulaires restant sur les bords des glomérules ainsi qu'une compartimentation, ou ségrégation, des astrocytes qui semble très fortement liée à la disposition des glomérules. Cela montre clairement l'influence du réseau neuronal sur la disposition des réseaux astrocytaires dont les prolongements sont plus présents au centre des glomérules, là où la neurotransmission est maximale. Une corrélation entre les fluctuations des potentiels membranaires des astrocytes et le potentiel de champ local mesuré dans les glomérules olfactifs a d'ailleurs été démontrée [13].

#### **2/ *Déploiement-Rétraction des filaments astrocytaires selon l'état nutritionnel***

Dès 24h de jeûne, en partie dorsale du BO, l'aire occupée par les filaments astrocytaires dans les glomérules, est significativement diminuée par rapport aux rats nourris, sans accentuation significative de cet effet après 48h de jeûne. Aimé *et al.* (2007) ont décrit une augmentation



**Figure 17 : Plasticité morphologique astrocytaire observés dans les noyaux supra-optiques [27]**

Chez le rat, les neurones ocytocinergiques du noyau supra-optique présentent une activité régulée par la plasticité morphologique : en situation d'absence de stimulation, les astrocytes sont déployés et exercent une régulation sur la synapse glutamatergique par leur rôle de recapture du glutamate ; lors d'une stimulation, les astrocytes se rétractent et le glutamate extracellulaire s'accumule dans la fente synaptique.

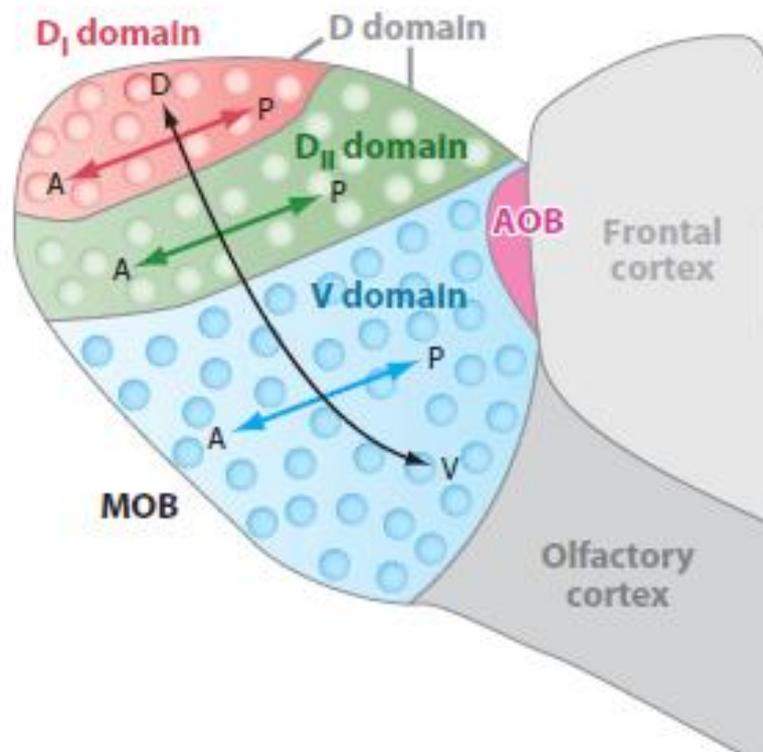
[tiré de OLIET SHR et BONFARDIN VDJ, *European Journal of Neuroscience*, 2010]

de la réponse olfactive lors de la privation alimentaire, et réciproquement une réduction en situation de satiété [29]. Nos résultats suggèrent que dès 24h de jeûne, la rétraction morphologique des filaments astrocytaires dans les glomérules olfactifs dorsaux libère les synapses des régulations assurées par l'astrocyte, ce qui pourrait en conséquence accroître la capacité olfactive passant par les glomérules dorsaux, chez nos animaux. Des études précédentes dans des noyaux hypothalamiques ont montré le lien étroit entre la couverture astrocytaire capable de plasticité morphologique et l'adaptation à un changement environnemental ou physiologique. Par exemple, Servièrre et Lavialle (1996) ont montré un mécanisme de déploiement-rétraction astrocytaire selon le rythme circadien : dans le noyau supra-chiasmatique (NSC, siège de l'horloge circadienne), en réponse à l'information lumineuse de la phase diurne, les astrocytes se déploient alors qu'en phase nocturne, à l'obscurité, les astrocytes rétractent leurs prolongements (*fig.16* [11]). Dans le noyau supra-optique, lors de la lactation, de la déshydratation ou de la parturition, la rétraction des filaments astrocytaires induit une accumulation du glutamate extracellulaire au niveau des synapses modifiant la transmission synaptique (*fig.17* [30]).

Nos résultats sur le BO suggèrent également des changements astrocytaires entre deux situations :

1/ en situation de satiété, les astrocytes déploient leurs prolongements au sein des glomérules et contrôlent ainsi étroitement la neurotransmission glutamatergique entre les neurones olfactifs et les cellules mitrales (en éliminant rapidement le glutamate synaptique, en libérant des gliotransmetteurs agissant sur la synapse, en coordonnant des synapses distantes via la propagation de vagues calciques [31]) dans une situation où le statut métabolique ne réclame pas d'amplification de la sensibilité vis-à-vis des odeurs alimentaires;

2/ lors du jeûne (24h ou 48h) : les prolongements astrocytaires se rétractent, et permettent une transmission de l'influx glutamatergique non régulée par l'astrocyte. Cette rétraction de la présence astrocytaire peut, entre autre, permettre une diffusion prolongée ou extra-synaptique du glutamate (suppression de la capture astrocytaire) et modifier le mode et l'intensité de la transmission entre neurones olfactifs et cellules mitrales, au niveau des glomérules dorsaux. L'efficacité de la perception olfactive pourrait ainsi être stimulée en situation où la recherche de nourriture devient cruciale [11, 33].



**Figure 18 : Schéma de l'organisation fonctionnelle du bulbe olfactif d'un rongeur, en vue latérale (BO du rongeur) [18]**

On distingue 3 domaines de glomérules olfactifs, correspondant à une activation des glomérules selon des odeurs de fonctionnalité différente. Les flèches doubles colorées indiquent l'axe antéro-postérieur (A-P) de chaque domaine. La flèche double noire indique l'axe dorso-ventral (D-V) de la « carte olfactive ». AOB : Bulbe Olfactif Accessoire ; D : Domaine Dorsal ; D I : sous-domaine I du domaine D ; D II : sous-domaine II du domaine D ; V : domaine V (ventral).

[tiré de MORI K et SAKANO H. *Annu. Rev. Neurosci.* 2011]

Ainsi comme dans d'autres régions du système nerveux central, l'organisation spatiale des réseaux astrocytaires et la modification morphologique des prolongements astrocytaires au sein des glomérules pourraient être le support d'une méta-régulation astrocytaire impliquant la coordination des réseaux neuronaux en réponse à des changements physiologiques et/ou sensoriels.

### **Régionalisation dorso-ventrale de la régulation des astrocytes**

Du côté ventral du BO, le déploiement astrocytaire des coupes analysées ne semble pas varier avec le jeûne. Ce résultat suggère un mécanisme de plasticité morphologique astrocytaire restreint aux glomérules dorsaux du BO. Ceci pourrait s'expliquer par une localisation de la neurotransmission et de l'intégration des stimuli olfactifs alimentaires utilisés dans notre étude préférentiellement en partie dorsale du BO [28]. Dans le schéma présenté par Mori *et al.* (1999), on observe une régionalisation en 4 zones de récepteurs olfactifs distincts dans l'épithélium olfactif et des expériences d'hybridation *in situ* suggèrent fortement la projection des axones des NSO issus de ces 4 zones vers 4 autres zones distinctes du BO, s'alignant selon un axe rostro-dorsal vers ventro-latéral (*fig.14*). Plus récemment, ces observations ont été complétées par des données sur l'expression de diverses classes de récepteurs olfactifs : on distingue désormais 3 domaines de glomérules olfactifs distincts, activés par différents types d'odeurs. Il est intéressant de noter qu'un ensemble de glomérules dorsaux (dans le domaine D I, *fig.18*) est activé lorsque la souris est en présence d'odeur de nourriture avariée [32]. On peut donc envisager que la régulation de la sensibilité vis-à-vis des odeurs alimentaires passe préférentiellement par une régulation au niveau des glomérules dorsaux.

### **SYNAPSE GLUTAMATERGIQUE : Régulation des marqueurs astrocytaires**

La neurotransmission dans les synapses des glomérules du BO est principalement portée par le glutamate. De façon stratégique, les astrocytes sont positionnés à l'interface entre les vaisseaux sanguins et les synapses [33]. Dans le BO, les astrocytes expriment un niveau élevé de transporteurs du glutamate GLAST et GLT-1, notamment au niveau des synapses concentrées dans les glomérules, suggérant ainsi leur rôle de « senseur » métabolique et leur participation active dans la régulation de la neurotransmission [34]. Par ailleurs, le processus de plasticité morphologique astrocytaire décrit dans d'autres structures cérébrales (le noyau supra-optique et le noyau circadien) relie un changement de morphologie des filaments astrocytaires au contact des synapses à une concentration de glutamate (support de l'influx nerveux) plus ou moins importante [11, 30]. En réponse à un changement de l'activité



neuronale, l'influx glutamatergique plus ou moins fort est détecté par les transporteurs du glutamate astrocytaires, qui génèrent un influx calcique proportionnel, pouvant conduire à une réponse astrocytaire de rétraction ou de déploiement des filaments au sein des synapses. Ce changement morphologique astrocytaire a pour conséquence une recapture plus ou moins importante du glutamate présent dans la fente synaptique, via GLAST, GLT-1 et GS notamment. La Glutamine Synthase (GS) est l'enzyme permettant de redistribuer aux neurones le glutamate capturé sous forme de glutamine. Son expression varie généralement proportionnellement à celle des transporteurs de glutamate et en fonction de l'intensité de la neurotransmission glutamatergique.

Nos résultats ne montrent pas de modification quantitative de l'expression de GLAST et GS en situation de jeûne (24 ou 48h), ni sur l'expression du marqueur des filaments astrocytaires, la GFAP. Ces résultats, en particulier concernant la GFAP, semblent en contradiction avec nos données d'immunohistochimie montrant une diminution du marqueur astrocytaire GFAP avec le jeûne au sein des glomérules dorsaux du BO. Une explication possible à cette incohérence est que la quantification en Western Blot a été réalisée sur des extraits de BO complets (la quantification des marqueurs inclue donc l'ensemble des glomérules et les astrocytes présents en grand nombre au niveau des couches non glomérulaires du BO), et ne peut donc montrer un effet du jeûne que nous n'avons décelé en immunohistochimie que sur la zone restreinte des glomérules dorsaux. Pour vérifier cette hypothèse, il faudrait quantifier l'expression des marqueurs astrocytaires, à la lumière des premiers résultats, en essayant de réaliser une microdissection des glomérules dorsaux sur tissu frais avant Western blot.

### **NPY-Y1R : INTEGRATION d'UN SIGNAL NEUROENDOCRINE**

Nous avons quantifié la variation de l'expression du récepteur Y1R du neuropeptide Y en tant que marqueur de l'intégration de signaux neuroendocrines liés à l'état métabolique. Le NPY est un facteur orexigène dont l'ARNm est fortement exprimé dans le BO [1] : son rôle est de stimuler la prise alimentaire en situation de jeûne ou de déficit métabolique. Des travaux préliminaires de l'unité N.B.O. ont montré la co-localisation du récepteur NPY-Y1R et de la GFAP, nous permettant de conclure à la présence de NPY-Y1R sur les astrocytes. Nos analyses montrent une augmentation de l'expression de NPY-Y1R dans le BO dès 24h de jeûne, par rapport aux animaux nourris, une observation en cohérence avec le rôle orexigène du NPY, mettant en jeu l'activation des récepteurs NPY-Y1R en situation de jeûne, démontrée dans la MO [35, 36]. L'augmentation de la quantité de récepteurs astrocytaires NPY-Y1R pourrait permettre une meilleure intégration de la situation métabolique par les



astrocytes. Ainsi, en situation de jeûne, l'amplification de l'intégration du signal orexigène NPY par les astrocytes pourrait participer à la rétraction des prolongements astrocytaires et permettre une modification de la neurotransmission entre NSO et cellules mitrales, dans le but d'accroître la sensibilité olfactive.

D'autres hormones et peptides neuroendocrines ainsi que leurs récepteurs spécifiques pourraient être impliqués dans l'adaptation de la performance olfactive à l'état nutritionnel. On peut citer la ghréline qui est un peptide orexigène essentiellement produit par l'estomac en phase pré-prandiale. L'expression importante d'un de ses récepteurs au niveau des glomérules olfactifs a été démontré (GHSR-1a, [37]). Connaissant l'effet inhibiteur de l'insuline sur la performance olfactive [38], le dosage de l'insuline comme signal anorexigène serait aussi pertinent. Celle-ci est sécrétée suite à un pic de glycémie en phase post-prandiale. L'interprétation des concentrations de ces deux facteurs neuroendocrines est plus difficile car ils sont sécrétés de façon pulsatile. La leptine est également impliquée dans la régulation de la sensibilité olfactive en fonction de l'état métabolique [15], et présente des récepteurs au niveau du BO. Elle provoque par ailleurs un déploiement astrocytaire dans le noyau arqué de l'hypothalamus [39]. La comparaison de l'expression de ces marqueurs dans le BO, ainsi que de leurs récepteurs, en situation de faim ou de satiété, en relation avec le déploiement astrocytaire seraient des perspectives pertinentes pour la poursuite de notre étude.



## CONCLUSION et PERSPECTIVES

Notre étude chez le rat montre qu'une situation de jeûne modéré (24h) ou prolongé (48h) diminuant le poids corporel, la glycémie et la leptinémie, induit une rétraction des prolongements astrocytaires au niveau des glomérules dorsaux du BO. Nos résultats montrant une augmentation de l'expression du récepteur Y1R du NPY, essentiellement astrocytaire au niveau du BO, ouvrent la piste d'un rôle du NPY, principal facteur orexigène, dans cette plasticité morphologique des astrocytes glomérulaires. Ces premiers résultats montrent la régulation possible des réseaux astrocytaires présents abondamment dans les glomérules olfactifs en fonction de l'état métabolique. Les effets du jeûne observés au cours de cette première étude doivent maintenant être confirmés, afin d'augmenter la puissance des tests statistiques réalisés, et d'affiner certaines approches (Western Blot sur les glomérules dorsaux du BO).

Un de nos objectifs d'étude était de relier le déploiement astrocytaire à l'activation neuronale. Le marquage de la protéine c-Fos en immunohistochimie aurait permis de visualiser les neurones et glomérules spécifiquement activés après stimulation olfactive. Nous n'avons pas réussi à mettre cette approche au point dans le cadre de ce stage mais cela reste une piste importante à explorer, surtout compte tenu des effets observés exclusivement sur les glomérules dorsaux en immunohistochimie. Il sera donc intéressant de relier la plasticité morphologique astrocytaire à l'activation de certains glomérules par l'odeur de l'aliment. Une autre piste pour faire le lien avec l'activation glomérulaire est le marquage de V-Glut2, un transporteur vésiculaire neuronal du glutamate, reflétant l'intensité de la transmission glutamatergique. Le concept d'activation d'ensembles précis de glomérules olfactifs, en réponse à des odeurs données, pose la question du support de la discrimination des odeurs. L'activation glomérulaire régionalisée est-elle liée à la structure chimique ou à la fonctionnalité/signification des odeurs ? Il paraît plus pertinent de penser que les odeurs sont plus ou moins « filtrées » (via la modulation neuronale et gliale au niveau du BO) selon la signification de la molécule odorante pour l'animal. Avec une forte influence du contexte environnemental et émotif ainsi que de notre histoire passée, les odeurs que nous sentons sont associées à des sensations de plaisir, nostalgie, dégoût, peur... Dans une perspective évolutive, il est important que certaines odeurs, menant à un comportement positif pour la survie de l'individu et de son espèce, puissent être « renforcées », c'est-à-dire mieux détectées dans des situations particulières. Les mécanismes de plasticité morphologique astrocytaire en vue de l'adaptation de la sensibilité olfactive à l'état nutritionnel s'inscrivent dans ce schéma :



en modifiant l'environnement synaptique au niveau des glomérules concernés, la méta-régulation astrocytaire renforcerait la motivation alimentaire et la capacité de recherche de nourriture en situation de jeûne.



## Références bibliographiques

- [1]PALOUZIER-PAULIGNAN B et al. Olfaction Under Metabolic Influences, *Chem. Senses*, 2012, 37, pp 769-797.
- [2]CABANAC M et DUCLAUX R. Alliesthésie olfacto-gustative et prise alimentaire chez l'homme, *J. Physiol*, 1973, 66, pp 113-135.
- [3]ASCHENBRENNER K et al. The influence of olfactory loss on dietary behaviors, *Laryngoscope*, 2008, 118, 1, pp 135-44.
- [4]CAMERON EL. Pregnancy and olfaction: a review, *Frontiers in psychology*, 2014, 5, 67, pp 1-11.
- [5]HUART C, ROMBAUX P et HUMMEL T. Plasticity of the Human Olfactory System: The Olfactory Bulb, *Molecules*, 2013, 18, pp11586-11600
- [6]PURVES D et al. The Olfactory Bulb.Neuroscience.2nd edition, 2001, editors: Sunderland (MA): *Sinauer Associates*.
- [7]RUBIN BD et KATZ LC, Optical Imaging of Odorant Representations in the Mammalian Olfactory Bulb, *Neuron*, 1999, 23, pp499-511.
- [8]ALLEN NJ et BARRES BA. Glia-more than just brain glue, *Nature*, 2009, 457, pp 675-677.
- [9]MIN R, SANTELLO M et NEVIAN T. The computational power of astrocyte mediated synaptic plasticity. *Frontiers in computational neuroscience*, 2012, 6, 93, p 1-15.
- [10]THEODOSIS DT, POULAIN DA et OLIET SHR. Activity-Dependent Structural and Functional Plasticity of Astrocyte-Neuron Interactions. *Physiol Rev.*, 2008, 88, pp 983-1008.
- [11]SERVIERE J et LAVIALLE M. Astrocytes in the mammalian circadian clock: putative roles.*Progress in Brain Research*, 1996, 11, pp57-73.
- [12]DE SAINT JAN D et WESTBROOK GL. Detecting activity in olfactory bulb glomeruliwith astrocyte recording. *J Neurosci*.2005, 25, pp 2917-2924.
- [13]ROUX L et al. Plasticity of astroglial networks in olfactory glomeruli, *PNAS*, 2011, 108, 45, pp 18442-18446.
- [14]MARTIN C et al.Alterations of sensory-evoked metabolic and oscillatory activities in the olfactory bulb of GLAST-deficient mice, *Frontiers in Neural Circuits*, 2012, 6, pp 1-12.
- [15]PRUD'HOMME MJ et al. Nutritional status modulates behavioural and olfactory bulb Fos responses to isoamyl acetate or food odour in rats: role of orexin and leptin, *Neuroscience*, 2009, 162, pp 1287-1298.
- [16]GRAY'S ANATOMY, 40th Edition.*The Anatomical Basis of Clinical Practice*, Expert Consult - Online and Print, 2009,By Susan Standring, PhD, DSc.
- [17]GAGE GJ, KIPKE DR, SHAIN W, Whole Animal Perfusion Fixation for Rodents. *J. Vis. Exp.*, 2012, 65, e3564.
- [18] HABOLD C. Mécanismes cellulaires et moléculaires de l'absorption intestinale au cours du jeûne et après réalimentation (thèse), 2004, Université Louis Pasteur, Strasbourg.
- [19]CHEREL Y et al. Relationships between lipid availability and protein utilization during prolonged fasting. *J Comp Physiol*. 1991, 162, pp305-13.
- [20]JONES HRP, OATES J et TRUSSEL BA. An applied approach to the assessment of severity.Humane endpoints in animal experiments for biomedical. *Research*, 1998, pp 40-47.



- [21]**ZMIEC Z. et al.**The effects of fasting and refeeding on adrenal cortex morphometry and serum concentrations of ACTH and corticosterone in young and old male rats. *Journal of Physiology and Pharmacology*, 2006, 57, 6, pp 77-84.
- [22]**ISSAD T. et al.** Effects of fasting on tissue glucose utilization in conscious resting rats, *Biochem. J.*, 1987, 246, pp241-244.
- [23]**KOHN DF et CLIFFORD CB.**Biology and diseases of rats.*Laboratory Animal Medicine*, 2nd ed. New York: AcademicPress, 12151672002 5.
- [24]**PERRIN D.** Caractérisation de la balance énergétique et de son contrôle monoaminergique central et périphérique chez un modèle de rat ne développant pas d'obésité, le rat Lou/C (thèse), 2003, Université Claude Bernard, Lyon.
- [25]**ROWLAND NE.** Food or fluid restriction in common laboratory animals: balancing welfare considerations with scientific inquiry. *Comparative Medicine*, 2007, 57, 2, pp 149-160.
- [26]**NOWLAND MH, HUGUNIN KMS, ROGERS KL.** Effects of short-term fasting in male Sprague-Dawleyrats.*Comparative Medicine*, 2011, 61, 2, pp138-7.
- [27]**MOMBAERTS P et al.**Visualizing an Olfactory Sensory Map, *Cell*, 1996, 87, pp 675–686.
- [28]**MORI K et al.**The Olfactory Bulb: Coding and Processing of Odor Molecule Information. *Science*, 1999, 286, pp711-715.
- [29]**AIME P et al.** Hunger increases and satiation decreases rat olfactory detection performances for a neutral odor, *Behav. BrainRe.* 2007, 179, pp 258–264.
- [30]**OLIET SH, PIET R et POULAIN DA.**Control of glutamate clearance and synaptic efficacy by glial coverage of neurons.*Science*, 2001, 292, pp923-6.
- [31]**HALASSA MM et HAYDON PG.** Integrated Brain Circuits: Astrocytic Networks Modulate Neuronal Activity and Behavior, *Annu. Rev. Physiol.*, 2010, 72, pp 335–55.
- [32]**MORI K et SAKANO H.**How Is the Olfactory Map Formed and Interpreted in the Mammalian Brain?*Annu. Rev. Neurosci.* 2011, 34, pp 467–99.
- [33]**PETZOLD GC et al.**Coupling of neural activity to blood flow in olfactory glomeruli is mediated by astrocytic pathways, *Neuron*, 2008, 58, 6, pp 897-910.
- [34]**UTSUMI M et al.**Differential expression patterns of three glutamate transporters (GLAST, GLT1 and EAAC1) in the rat main olfactory bulb.*BrainResMolBrainRes.*2001, 92, pp1-11.
- [35]**DECRESSAC M et al.** Neuropeptide Y stimulates proliferation, migration and differentiation of neural precursors from the subventricular zone in adult mice, *Neurobiology of Disease*, 2009, 34, pp 441-449.
- [36]**NEGRONI J et al.** Neuropeptide Y Enhances Olfactory Mucosa Responses to Odorant in Hungry Rats, *PLoS ONE*, 2012, 7, 9, e45266.
- [37]**TONG J et al.** Ghrelin enhances olfactory sensitivity and exploratory sniffing in rodents and humans, *J Neurosci.* 2011, 31, 15, pp 5841-5846.
- [38]**AIME P et al.**A Physiological Increase of Insulin in the Olfactory Bulb Decreases Detection of a Learned Aversive Odor and Abolishes Food Odor-Induced Sniffing Behavior in Rats, *Plos One*, 2012, 7, 12, e51227.
- [39]**FUENTE-MARTIN E et al.** Leptin regulates glutamate and glucose transporters in hypothalamic astrocytes, *Clin Invest.*,2012, 122, 11, pp 3900-3913.