



**HAL**  
open science

# Effet d'une exposition odorante pré et post-natale sur le développement des préférences médiées par l'olfaction chez la souris - Mécanismes de neuromodulation

Aurélie Dewaele

## ► To cite this version:

Aurélie Dewaele. Effet d'une exposition odorante pré et post-natale sur le développement des préférences médiées par l'olfaction chez la souris - Mécanismes de neuromodulation. Biologie animale. Université Paris Saclay (COMUE), 2017. Français. NNT : 2017SACLA013 . tel-01749772

**HAL Id: tel-01749772**

**<https://theses.hal.science/tel-01749772>**

Submitted on 29 Mar 2018

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

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

NNT : 2017SACLA013

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

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

Spécialité de doctorat : Sciences animales

par

**Aurélié DEWAELE**

**Effet d'une exposition odorante pré et post-natale sur le développement des  
préférences médiées par l'olfaction chez la souris -  
Mécanismes de neuromodulation**

**Thèse présentée et soutenue à Jouy-en-Josas, le lundi 3 Avril 2017 :**

**Composition du Jury :**

Madame JACQUIN-JOLY Emmanuelle	DR INRA Versailles	Présidente du jury
Madame PARNET Patricia	DR INRA – Université de Nantes	Rapporteur
Monsieur FERREIRA Guillaume	DR INRA – Université de Bordeaux	Rapporteur
Madame McLEAN Heather	MC CNRS – Université Paris-Sud	Examinatrice
Monsieur PATRIS Bruno	IR CNRS – Université de Bourgogne	Examinateur
Madame BALY Christine	CR INRA Jouy-en-Josas	Directrice de thèse

## Remerciements

En premier lieu, je souhaite remercier la directrice de l'unité Neurobiologie de l'Olfaction (NBO), Edith Pajot, pour m'avoir permis de mettre de côté mon activité de technicienne de laboratoire pendant 3 ans afin que je puisse me consacrer pleinement à cette thèse, et la réaliser dans d'excellentes conditions.

Je tiens ensuite à remercier les rapporteurs de cette thèse, Patricia Parnet et Guillaume Ferreira, et les examinateurs, Heather McLean, Emmanuelle Jacquin-Joly et Bruno Patris, pour avoir accepté de faire partie de ce jury de thèse et d'évaluer mon travail.

Puis, je remercie les membres de mon jury de suivi de thèse, Christine Duvaux-Ponter, Caroline Dubacq, Benoist Schaal et Jean-Jacques Rémy, pour le suivi de l'avancée de mon travail pendant ces 3 années et pour avoir permis d'éclaircir et d'approfondir nos questions de recherche.

Ensuite, j'adresse mes remerciements chaleureux à ma directrice de thèse, Christine Baly, pour avoir cru en moi et m'avoir permis de réaliser cette thèse. Merci pour tout le temps que tu m'as consacré, pour tous les conseils scientifiques et techniques que tu as pu m'apporter, toutes les relectures etc... Merci de m'avoir donné la chance de « grandir » scientifiquement à tes côtés pendant ces trois dernières années, même si cela n'a pas été tous les jours facile et que j'ai encore beaucoup de chemin à faire !!!

Mes remerciements vont à présent aux financeurs de ce projet de thèse, le département Physiologie animale et systèmes d'élevage (PHASE) de l'INRA, qui ont accordé leur confiance à ce projet.

Ensuite, je tenais tout particulièrement à remercier Marie-Annick Persuy pour tout l'aide qu'elle a pu m'apporter, notamment pour la partie GC-MS/MS, la gestion des animaux et tout le reste ! Et à Karine Badonnel, pour le traitement statistique des données (et elles furent nombreuses !), ses conseils, nos discussions scientifiques mais pas que... merci à toi de m'avoir soutenu dans cette difficile épreuve !

Je remercie Nicolas Meunier pour avoir réalisé les EOGs, pour la relecture de l'Introduction de ce manuscrit, les différents conseils qu'il a pu me donner sur ce travail de thèse et aussi pour nos nombreuses discussions autour de la course à pied !

Puis je tenais à remercier Angélique pour les conseils qu'elle a pu nous apporter en tant qu'éthologiste sur les tests comportementaux, sa relecture de l'article ainsi que toutes nos discussions annexes pendant nos pauses « thé », et à Vincent Lalère, étudiant en Master 1, qui a contribué aux résultats des manips stress.

Merci à Johan Castille et Bruno Passet, de l'unité GABI, pour les précieux conseils qu'ils nous ont fourni lors de la mise en place du modèle d'exposition à l'heptanal, et pour leur aide technique notamment pour les prélèvements de liquides amniotiques et de laits.

Merci également à Didier pour son aide technique, à Gilbert Boyer pour la préparation des croquettes et à Pascal Dufrien pour nous avoir construit des dispositifs d'Open-Field et de planche à trous sur mesure.

Merci à l'ensemble du personnel de l'unité NBO, qui a contribué de près ou de loin à mon travail de thèse.

Je remercie la plateforme d'imagerie MIMA2 et plus particulièrement Pierre Adenot et Martine Letheule, et la plateforme UPMC à Paris pour la réalisation des analyses GC-MS/MS.

Je remercie l'ensemble du personnel de l'animalerie du centre (Unité Expérimentale d'Infectiologie Expérimentale des Rongeurs et des Poissons - UEIERP), et plus particulièrement Jérôme Pottier, Charline Pontlevoy et Marlène Hery, pour les soins apportés aux souris.

Merci à l'ensemble des partenaires du projet ODORALIM.

A tous mes amis, ma famille, mes proches, que j'ai pu fatiguer en leur racontant « mes histoires et mes problèmes de thésarde », et plus particulièrement à Cédric qui me supporte au quotidien ! Sans oublier Jojo, mon fidèle destrier, avec qui j'ai pu m'évader pendant les moments difficiles...

# TABLE DES MATIERES

<b>LISTE DES ABREVIATIONS .....</b>	<b>4</b>
<b>INTRODUCTION.....</b>	<b>6</b>
<b>Avant-propos .....</b>	<b>6</b>
<b>Chapitre I : le système olfactif : organisation, développement et régénération .....</b>	<b>8</b>
I. Historique : l'odorat, un sens oublié.....	8
II. Organisation générale du système olfactif .....	10
A. Système olfactif principal et accessoire .....	10
B. Autres organes du système olfactif.....	11
III. Anatomie du système olfactif principal .....	12
A. Organisation de la muqueuse olfactive .....	13
1) Anatomie de la MO .....	13
2) Neurones sensoriels olfactifs (NSO) .....	14
a) Morphologie des NSOs .....	14
b) Gènes codant pour les ROs.....	14
c) Structure des ROs .....	16
d) Transduction du signal chimique en signal électrique .....	16
e) Codage combinatoire de l'information olfactive .....	17
3) Cellules de soutien ou cellules sustentaculaires .....	18
4) Cellules basales .....	19
B. Organisation du bulbe olfactif .....	19
1) Anatomie du bulbe olfactif.....	19
a) Les différentes couches du bulbe olfactif.....	21
b) Les différents types cellulaires du bulbe olfactif .....	22
2) Projections axonales et glomérules du BO.....	24
3) Transmission synaptique au niveau des glomérules.....	25
IV. Développement fœtal du système olfactif chez le rongeur et l'humain .....	27
A. Développement fœtal de la muqueuse olfactive chez le rongeur .....	27
B. Développement fœtal du nerf olfactif et apparition des glomérules chez le rongeur .....	28
C. Développement fœtal du système olfactif chez l'humain .....	33
V. Renouvellement et régénération de la MO et des projections axonales .....	33
<b>Chapitre II : Détection, discrimination et préférence olfactive fœtale et odeurs dans le liquide amniotique et le lait.....</b>	<b>37</b>
I. Développement précoce du système olfactif et fonctionnalité pendant la vie fœtale et les premiers jours de vie <i>ex utero</i> .....	37
II. Réponses comportementales du nouveau-né engendrées par l'odeur du liquide amniotique et du lait maternel .....	40
A. Réponses comportementales du nouveau-né engendrées par les odeurs contenues dans le liquide amniotique .....	40
B. Réponses comportementales engendrées par l'odeur du lait maternel .....	42
C. Discontinuité sensorielle entre environnement <i>in</i> et <i>ex utero</i> .....	44
D. Autres effets comportementaux liés aux odeurs maternelles.....	45
III. Effet de l'alimentation de la mère sur l'odeur du liquide amniotique et du lait .....	47
<b>Chapitre III : Environnement olfactif périnatal et influence sur les préférences olfactives et alimentaires, la structuration du système olfactif et la modulation du stress.....</b>	<b>51</b>
I. Odorisation prénatale, postnatale et périnatale : influence sur le comportement médié par l'olfaction et les odeurs alimentaires et sur le comportement alimentaire.....	51
A. Influence sur le comportement médié par l'olfaction et les odeurs alimentaires.....	51

1)	Influence sur le comportement médié par l'olfaction à la naissance (PNO à PN3) .....	52
2)	Influence sur le comportement médié par l'olfaction avant le sevrage .....	54
B.	Influence sur le comportement alimentaire .....	57
II.	Exposition odorante et effets sur la plasticité du système olfactif.....	59
A.	Modifications des projections axonales induites par une diminution de l'activité neuronale olfactive au cours du développement des glomérules. ....	60
1)	Modifications engendrées par la suture d'une narine à la naissance .....	60
2)	Blocage de la transduction du signal olfactif dès la naissance .....	63
B.	Modifications des projections axonales induites par un changement dans l'environnement olfactif au cours du développement des glomérules. ....	65
C.	Autres effets d'une exposition odorante périnatale.....	68
1)	Effets d'une exposition odorante postnatale sur l'expression des récepteurs olfactifs de l'EO septal .....	68
2)	Effets d'une exposition odorante prénatale ou postnatale sur l'amplitude de réponse des NSOs. ....	69
D.	Exposition odorante périnatale et modulation du stress .....	72
<b>Chapitre IV : Problématique posée lors de la thèse .....</b>		<b>76</b>

## **RESULTATS ..... 78**

<b>Chapitre I : Mise en place d'un modèle d'odorisation périnatale .....</b>		<b>78</b>
I.	Mise en place du design expérimental d'odorisation : modèle <i>mI7-GFP</i> .....	78
A.	Choix de la lignée de souris transgénique : <i>mI7-IRE5-tauGFP</i> .....	78
B.	Choix du ligand odorant.....	80
C.	Choix de la fenêtre temporelle d'exposition odorante .....	81
D.	Choix des stades de développement étudiés .....	82
E.	Choix des conditions d'odorisation des croquettes .....	82
II.	Données métaboliques .....	83
A.	Conditions d'élevage souris .....	83
B.	Effet de l'odorisation sur les paramètres d'élevage des souris <i>mI7-GFP</i> .....	84
C.	Effet de l'odorisation sur la consommation journalière maternelle en nourriture NO et HEP.....	85
D.	Recherche de la présence d'heptanal dans le liquide amniotique et le lait des souris <i>mI7-GFP</i> .....	87
1)	Protocole expérimental.....	87
a)	GC-MS/MS.....	87
b)	Prélèvements de liquide amniotique .....	88
c)	Prélèvements de laits .....	88
2)	Résultats.....	88
a)	Etalonnage de l'appareil pour le composé recherché.....	88
b)	Recherche de l'heptanal dans les fluides biologiques prélevés .....	89
E.	Effets d'une exposition périnatale à l'heptanal sur le comportement olfactif des souriceaux à PN3.....	93
1)	Protocole expérimental.....	93
2)	Résultats.....	93
F.	Effet d'une exposition odorante périnatale sur la réponse de la MO à des stimulations à l'heptanal – ElectroOlfactoGramme (EOG) à PN12 .....	95
1)	Protocole expérimental.....	95
2)	Résultats.....	96
a)	Paramètres métaboliques : poids des souriceaux.....	97
b)	Enregistrements EOG .....	97
G.	Changement de modèle suite aux problèmes rencontrés.....	98
III.	Validation du modèle d'odorisation : modèle de souris <i>mI7-GFP</i> adopté par des CD1 .....	99
A.	Protocole d'adoption .....	99
B.	Consommation journalière en nourriture NO et HEP. ....	100
C.	Validation du modèle.....	102
1)	Effets de l'adoption sur le pourcentage de survie des souriceaux.....	102
2)	Effets de l'adoption sur la croissance des souriceaux .....	103
3)	Recherche de la présence d'heptanal dans le lait des souris CD1 .....	105

4) Effets de l'exposition odorante à l'heptanal sur la croissance des souriceaux jusqu'au sevrage	106
5) Conclusions	107
<b>Chapitre II : Effets d'une exposition périnatale à l'heptanal sur les préférences médiées par l'olfaction et sur la plasticité du système olfactif</b>	<b>109</b>
<b>Abstract</b>	<b>111</b>
<b>Introduction</b>	<b>112</b>
<b>Material and methods</b>	<b>116</b>
<b>Results</b>	<b>122</b>
<b>Discussion</b>	<b>126</b>
<b>References</b>	<b>130</b>
<b>Figures</b>	<b>134</b>
<b>Chapitre III : Effets d'une exposition odorante périnatale à l'heptanal sur la modulation du stress au moment du sevrage</b>	<b>141</b>
I. Problématique posée	141
II. Matériel et méthodes	143
A. Choix du modèle expérimental	143
B. Conditions d'odorisation des mères CD1 à l'heptanal par l'alimentation	143
A. Conditions d'expérimentation des souriceaux	144
C. Traitement des données	145
III. Résultats	146
A. OPF réalisé en absence d'heptanal (OPF NO)	146
1) Effet sur la distance totale parcourue	146
2) Effet sur le temps passé en zone interne	146
B. OPF réalisé en présence d'heptanal (OPF HEP)	148
1) Effet sur la distance totale parcourue	148
2) Effet sur le temps passé en zone interne	149
B. Comparaison des données obtenues en OPF odorisé et non odorisé	150
<b>DISCUSSION ET PERSPECTIVES</b>	<b>153</b>
I. Démonstration de la présence de l'heptanal dans les fluides biologiques maternel	153
II. Effets comportementaux induits par une exposition périnatale à l'heptanal	154
A. Effets sur le comportement de préférence à l'heptanal	154
B. Effets sur le comportement de stress	156
III. Effets d'une exposition périnatale à l'heptanal sur la plasticité du BO et de la MO	157
A. Plasticité du BO	157
B. Plasticité de la MO	161
IV. Conclusion	161
V. Difficultés rencontrées	163
A. Difficultés liées au modèle d'odorisation	163
B. Difficultés liées à l'adoption	164
C. Choix de la fenêtre temporelle d'exposition odorante	166
D. Difficultés liées aux tests olfactifs	168
E. Difficultés liées au test OPF	169
VI. Conclusion générale	170
<b>Références bibliographiques</b>	<b>172</b>

## Liste des abréviations

ACIII : Adenylyl Cyclase de type III  
ACTH : Andrenocorticotropie hormon / hormone corticotrope  
AMPc : Adénosine 3', 5'-MonoPhosphate cyclique  
ATP : Adénosine triphosphate  
BO : Bulbe Olfactif  
BOA : Bulbe olfactif accessoire  
CBG : Cellule basale globulaire  
CBH : Cellule basale horizontale  
CN : Cavité nasale  
CNGA : Cyclic nucleotide-gated ion channels  
CPT : Cellule progénitrice transitoire  
EO : Epithélium olfactif  
EOG : Electroolfactogramme  
EPL : External plexiform layer  
ET : External tufted cell / cellule à panache externe  
GCL : Granular cell layer / couche des cellules granulaires  
GC-MS : Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse  
GFP : Green Fluorescent Protein  
GG : Ganglion de Grueneberg  
GL : Glomerular layer / couche glomérulaire  
GMPc : Guanosine monophosphate cyclique  
GNRH : Gonadotropin-releasing-hormon / gonadolibérine  
GTP : Guanosine triphosphate  
HEP : Heptanal  
HPA : Axe Hypothalamo-hypophyso-surrénalien  
HS-SPME : Headspace (HS) et micro-extraction en phase solide (SPME)  
IP3 : Inositol 1,4,5-triphosphate  
IPL : Internal plexiform layer / couche plexiforme interne  
IRES : Internal ribosome entry site  
JG : juxtaglomérulaire  
LHRH : Luteinizing Hormone Releasing Hormone / gonadolibérine  
Mash1 : Mammalian achaete-scute homolog 1



MC : Mitral cell / cellule mitrale  
MCL : Mitral cell layer / Couche des cellules mitrales  
MO : Muqueuse Olfactive  
Ngn1 : Neurogenin 1  
NO : Non odorisé  
NSO : Neurones sensoriels olfactifs  
OAP : Ortho-AminoacétoPhénone)  
OBP : Odorant Binding Protein  
OMP : Olfactory Marker Protein  
ONL : Olfactory nerve layer / couche du nerf olfactif  
OS : Organe septal de Masera  
OVM : Organe voméronasal  
PG : Periglomerular cell / cellule périglomérulaire  
PN : Post natal  
RCPG : Récepteurs couplés aux protéines G  
RO : Récepteur Olfactif  
SO : Système olfactif  
sSA : Short axon cell / cellule à axone court  
TM : Transmembranaire  
TMT : 2,5-dihydro-2,4,5-trimethylthiazoline

# INTRODUCTION

## Avant-propos

Chez les mammifères, le système olfactif principal possède toutes les caractéristiques structurales et fonctionnelles dans le dernier tiers du stade gestationnel. Ainsi, à un âge précoce, le fœtus est capable de détecter avec sensibilité, discriminer, et également mémoriser les odorants présents dans le liquide amniotique dans lequel il baigne. Chez le rongeur, ces odorants mémorisés *in utero* sont fondamentaux pour la survie du nouveau-né à la naissance en lui permettant de s'orienter vers la mamelle et de déclencher la tétée. Par la suite, ces odorants vont guider le nouveau-né dans ses choix olfactifs et alimentaires et favoriser ses apprentissages ultérieurs. Or, on sait que l'alimentation de la mère fait varier les clés olfactives des fluides biologiques (liquide amniotique, lait) et donc modifie la nature des sources olfactives rencontrées par le fœtus, puis le nouveau-né dans la période périnatale. Les conséquences neuroanatomiques et fonctionnelles de cette imprégnation font l'objet d'études récentes.

L'objectif de cette thèse a été de mettre en place un modèle d'exposition odorante périnatale via l'alimentation maternelle dans la lignée transgénique murine *mI7-GFP* exprimant le récepteur olfactif (RO) I7 couplé à la Green Fluorescent protéine (GFP), dont l'odorant préférentiel est l'heptanal (Bozza et al, 2002) et d'en évaluer les conséquences neuroanatomiques, moléculaires et comportementales sur le nouveau-né avant sevrage, et leur évolution au cours du temps en étudiant plus particulièrement les stades postnataux 3 (PN3), PN12-14 et PN21. Du fait de la fragilité de la lignée transgénique utilisée, nous avons travaillé sur des souriceaux *mI7-GFP* adoptés par des mères de lignée CD1 élevées dans les mêmes conditions d'odorisation. Nous avons caractérisé les effets d'une exposition odorante périnatale sur la maturation et le fonctionnement du système olfactif en lien avec la préférence olfactive jusqu'au sevrage sur des souriceaux *mI7-GFP* sous mères adoptives CD1 et sur la réaction à la séparation maternelle au sevrage sur souriceaux CD1 sous mère biologique.

La partie **Introduction** de ce manuscrit est organisée en 4 chapitres distincts. Dans le premier chapitre, l'organisation anatomique et fonctionnelle du système olfactif du mammifère sera présentée, plus particulièrement le système olfactif principal, sur lequel cette étude est portée, ainsi que son développement au cours de la vie embryonnaire et post-natale, et sa régénération tout au long de la vie. Le deuxième chapitre sera consacré à la détection, la

discrimination et les préférences olfactives fœtales ainsi que les odeurs présentes dans le liquide amniotique et le lait. Le troisième chapitre fera un état de l'art des effets de l'environnement olfactif périnatal sur les préférences olfactives et alimentaires, sur la structuration du système olfactif et sur la modulation du stress. Enfin, dans le quatrième chapitre, je présenterai brièvement la problématique de cette étude et les questions auxquelles nous avons souhaité répondre durant ce travail de thèse.

Puis la partie **Résultats** est organisée en 3 chapitres : un premier chapitre dans lequel seront présentés les résultats concernant la mise en place du modèle d'odorisation, un deuxième chapitre dans lequel seront présentés, sous forme d'un article, les résultats concernant les effets d'une exposition périnatale à l'heptanal sur les préférences guidées par l'olfaction et sur la neuroanatomie du bulbe olfactif (modèle souriceaux *mI7-GFP* adoptés par mère CD1) et un troisième chapitre dans lequel seront présentés les résultats concernant les effets d'une exposition périnatale à l'heptanal sur la modulation de la réaction à la séparation maternelle au sevrage (modèle souriceaux CD1 sous mère biologique CD1).

# Chapitre I : le système olfactif : organisation, développement et régénération

## I. Historique : l'odorat, un sens oublié

L'odorat est l'un des cinq sens qui fut pendant très longtemps négligé par les scientifiques.

D'un point de vue philosophique, ce sens était considéré comme mineur chez l'Homme, sans doute pour deux raisons essentielles. Premièrement, en comparaison au flair exacerbé de l'animal, l'olfaction chez l'Homme pouvait paraître très peu développée, et deuxièmement, comparée aux quatre autres sens, l'olfaction n'apparaissait pas comme un sens vital. Dès l'antiquité, les philosophes ont donc décrit l'idée de faiblesse et d'infériorité de ce sens. De plus, l'olfaction était très souvent confondue avec un autre sens qui est celui du goût, comme l'a écrit le philosophe grec Aristote dans son *Traité de la sensation et des choses sensibles* : « Ce qui relève des saveurs nous apparaît plus clairement que ce qui relève de l'odeur. La cause est que nous disposons d'un odorat nettement inférieur à celui des autres animaux et aux autres sens qui nous appartiennent, alors que notre toucher a beaucoup plus d'acuité que celui des autres animaux » (Chantal Jaquet, *Philosophie de l'odorat*, édition PUF, 2010). Il aura fallu attendre la fin du 19<sup>ème</sup> siècle pour que le philosophe allemand Friedrich Nietzsche donne de la valeur à ce sens oublié qu'est l'olfaction : « En nos sens, quels délicats instruments nous possédons ! Ce nez, par exemple, dont aucun philosophe n'a parlé avec respect et gratitude, est même pour l'instant l'instrument le plus fin dont nous disposions : il est capable de discerner des différences minimales de mouvement que le spectroscope ne distingue pas ».

D'un point de vue scientifique, le retard sur l'avancée des travaux entrepris sur l'étude de l'olfaction par rapport aux autres sens provient davantage, au niveau anatomique, de la difficulté d'accès de ces récepteurs sensoriels ainsi de la complexité de son codage que d'un manque d'intérêt. Tout d'abord en 1875, le médecin et histologiste italien Camillo Golgi, grâce à une nouvelle technique de coloration au nitrate d'argent, qu'il mit en place pour l'examen des tissus nerveux et qui lui valut le prix Nobel en 1906, fut un des premiers à fournir une représentation réaliste de la structure du bulbe olfactif principal (BO). A la même période, le neuroscientifique et histologiste espagnol Cajal, qui soutenait la doctrine neurale,

selon laquelle le neurone est l'unité anatomique et fonctionnelle de base du système nerveux, en opposition à la théorie réticulée développée par Golgi, put fournir davantage de précisions sur la structure du BO grâce à sa meilleure compréhension et donc interprétation de la coloration de Golgi par rapport à ses contemporains (Figueres-Onate et al, 2014). Puis grâce aux progrès en anatomie et en histologie, et à l'apparition du microscope électronique à partir des années 1930, la structure des organes sensoriels olfactifs et de leurs connexions nerveuses fut élucidée. Mais faute de techniques appropriées, les avancées en terme de compréhension des mécanismes de chémoréception stagnèrent. Au début des années 1950, les progrès en matière d'électronique et de techniques électro-physiologiques permirent aux scientifiques d'effectuer des enregistrements de l'activité électrique des cellules sensorielles. En 1955, Ottoson fut notamment le premier à effectuer les premiers électro-olfactogrammes sur la grenouille et montra une régionalisation de la sensibilité aux odorants chez cette espèce (Ottoson G., 1955). Puis arrivèrent les premiers enregistrements de réponses électriques de l'épithélium olfactif chez le poisson et le crapaud et du bulbe olfactif chez le crapaud (Shibuya T, 1960 ; Takagi SF et Shibuya T, 1960). A la fin des années 1970, les premières cartographies d'images sensorielles furent obtenues par autoradiographie au 2-désoxyglucose marqué au <sup>14</sup>C. Après ce riche apport de connaissances sur le fonctionnement neurosensoriel du système olfactif grâce à l'électrophysiologie, ce n'est qu'à partir du début des années 1990 que tout s'accéléra dans le domaine de la biologie moléculaire, avec la découverte des gènes codant pour les récepteurs olfactifs chez le rongeur par Linda Buck et Richard Axel (Buck et Axel, 1991), qui leur valut par la suite le prix Nobel de Médecine et de Physiologie en 2004. Ils montrèrent notamment que les récepteurs olfactifs font partie de la grande famille des récepteurs couplés à des protéines G (RCPG), et qu'il existe plusieurs centaines de gènes codant pour ces récepteurs chez le rat. S'en suivirent ensuite quelques années plus tard d'autres découvertes essentielles, comme les travaux de Mombaerts et de Ressler (Mombaerts et al, 1996a ; Ressler et al, 1994) qui montrèrent que les axones émis par les neurones sensoriels olfactifs qui expriment un même récepteur sont connectés à un même glomérule. Depuis, les recherches sur le fonctionnement de l'odorat ne cessent de progresser et connaissent de nos jours un vrai regain d'intérêt, tout particulièrement dans le domaine de la pharmacologie. En effet, la plupart des médicaments reposent sur une action ciblant des RCPGs. Mieux comprendre le fonctionnement des RCPG permettrait de créer des médicaments plus efficaces et avec moins d'effets secondaires. C'est ainsi qu'en 2012, les deux médecins américains Robert Lefkowitz et Brian Kobika ont obtenu le prix Nobel de

chimie pour leurs découvertes sur cette grande famille de récepteurs (Dixon et al, 1986 ; Kobika et al, 1987).

## II. Organisation générale du système olfactif

### A. Système olfactif principal et accessoire

Le système olfactif des mammifères se compose principalement de deux sous-systèmes : le système olfactif principal et le système olfactif accessoire.

Pour chacun de ces 2 systèmes, nous retrouvons une organisation structurale similaire. Des organes sensoriels distincts sont situés au niveau de la cavité nasale : la muqueuse olfactive (MO) composée en partie de neurones sensoriels olfactifs (NSOs) exprimant des récepteurs olfactifs (ROs) pour le système olfactif principal et l'organe voméronasal (OVM) composé en partie de neurones sensoriels voméronasaux (NSVs) exprimant principalement trois types de récepteurs, dont des neurorécepteurs spécifiques aux phéromones, pour le système olfactif accessoire (Rodriguez, 2004). Cependant, quelques études récentes ont montré l'expression de ROs au niveau des NSVs (Levai et al, 2006 ; Nakahara et al, 2016). Ces organes sensoriels sont connectés à des structures centrales distinctes qui assurent le traitement de l'information : le bulbe olfactif principal (BO) pour le premier et le bulbe olfactif accessoire (BOA) pour le second. (Figure 1).

Il a longtemps été admis que ces deux systèmes avaient des rôles différents : le système olfactif principal, grâce aux ROs présents au niveau de la MO, serait essentiellement responsable de la perception des composés odorants volatils présents dans l'environnement alors que le système olfactif accessoire, grâce aux récepteurs voméronasaux présents au niveau de l'OVM, serait responsable de la détection des phéromones, sécrétions biologiques produites par des glandes exocrines qui déclenchent des réponses physiologiques ou comportementales entre individus de la même espèce (Luo et al, 2003 ; Brennan et Zufall, 2006).

Le système olfactif principal, qui est celui qui concerne directement les travaux menés durant cette thèse, sera décrit plus précisément dans les paragraphes suivants.

Chez le rongeur, il a été montré que le système olfactif accessoire, via les phéromones, serait principalement impliqué dans l'activation de comportements liés à l'activité sexuelle, au niveau de la reconnaissance et l'attraction des partenaires (Del Punta et al, 2002), mais également dans la reconnaissance des prédateurs qui engendrerait ainsi un comportement de

fuite ou d'agression (Chamaro et al, 2007) et enfin dans les interactions mère-enfant (Brouette-Lahlou et al, 1999).

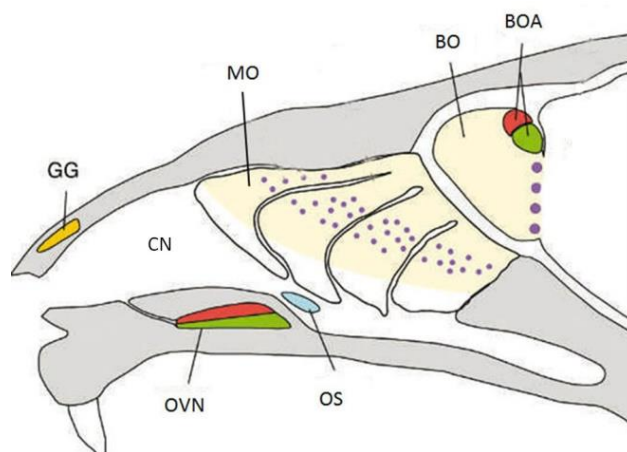
Néanmoins des études récentes ont montré que la MO serait également capable de détecter des phéromones (Boehm et al, 2005 ; Lin et al, 2005 ; Yoon et al, 2005) et inversement, le système olfactif accessoire serait également capable de détecter des odorants grâce aux récepteurs olfactifs également exprimés au niveau de l'OVM (Nakahara et al, 2016 ; Trinh et Storm, 2003).

## **B. Autres organes du système olfactif**

En plus des systèmes olfactifs principal et accessoire, d'autres sous-systèmes dont le rôle reste souvent encore équivoque coexistent. Ainsi l'organe septal de Masera (OS) et le ganglion de Grueneberg (GG) font également partie du système olfactif (**Figure 1**).

L'organe septal est un petit îlot d'épithélium localisé au niveau de la cavité nasale, à la base du septum, présentant des nombreuses similarités avec l'épithélium olfactif (EO). En effet, on y retrouve des neurones olfactifs qui projettent leur axone dans le BO principal mais dont la structure diffère un peu de ceux présents au niveau de l'EO. Le rôle de l'organe septal n'a pas encore été clairement identifié, mais il a été montré qu'il serait sensible à certains odorants (Marshall et Maruniak 1986), qu'il aurait la capacité de répondre à un large panel d'odorants et qu'il pourrait être impliqué dans la détection du rythme respiratoire (Gromaitre et al, 2007).

Le ganglion de Grueneberg, localisé à l'entrée de la cavité nasale, est quant à lui composé de cellules exprimant l'OMP (Olfactory Maker Protein), marqueur des neurones olfactifs matures, dont la morphologie diffère de celle des neurones sensoriels olfactifs présents au niveau de l'EO. En effet, ces cellules forment des grappes, elles possèdent un prolongement ressemblant à un axone qu'elles projettent vers le BO principal, mais sont dépourvues de prolongements dendritiques. Le rôle de ce ganglion reste à élucider. Néanmoins, il a été démontré chez la souris que certains de ses neurones répondraient au froid (Mamasuew et al, 2008), aux phéromones d'alarme (Brechtbühl et al, 2008), mais aussi à certains odorants (Mamasuew et al, 2011).



**Figure 1** : Organisation générale du système olfactif du rongeur en vue sagittale – GG : Ganglion de Grueneberg – CN : Cavité Nasale – MO : Muqueuse Olfactive – BO : Bulbe Olfactif – BOA : Bulbe Olfactif Accessoire – OVN : Organe VoméroNasal - OS : Organe Septal (schéma adapté de [Brennan et Zufall, 2006](#)).

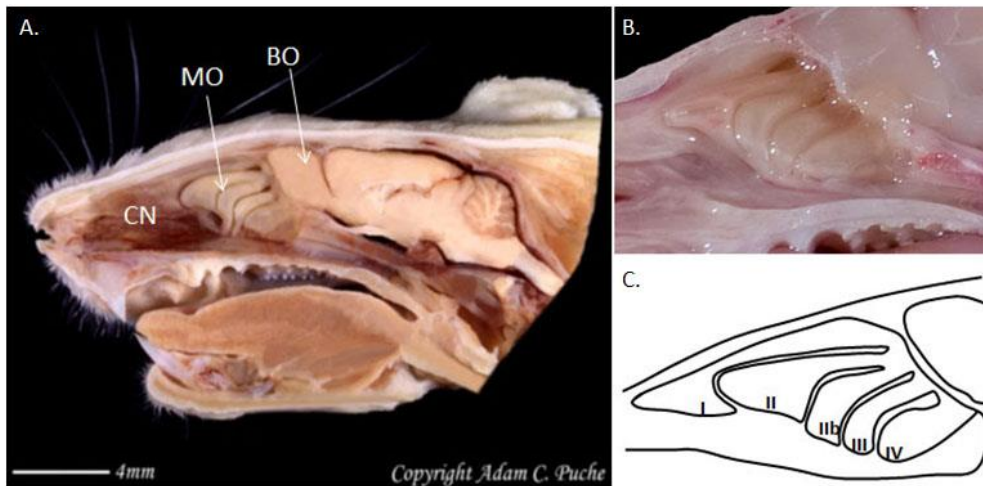
Pour l'ensemble de mon travail de thèse, nous nous sommes intéressés exclusivement à ce qui avait trait au système olfactif principal. C'est pourquoi je ne développerai pas davantage ce qui concerne le système olfactif accessoire ainsi que l'organe septal et le ganglion de Grueneberg.

Pour des raisons de simplification, la qualification de « principal » concernant le système olfactif et le bulbe olfactif sera donc omise dans la suite du manuscrit.

### III. Anatomie du système olfactif principal

Chez le rongeur, le système sensoriel olfactif est un système pair. Chaque animal dispose donc de deux MO et deux BO identiques disposés de part et d'autre du septum, cloison médiane séparant les deux cavités nasales (**Figure 2**). La MO est organisée en cinq cornets. Chaque cornet forme un repli cartilagineux recouvert d'EO, augmentant ainsi la surface totale d'épithélium.





**Figure 2** : Système olfactif principal – **A.** Photo d’une hémî-tête de rat en coupe sagittale mettant en évidence les 2 organes du système olfactif principal : muqueuse olfactive (MO) au fond de la cavité nasale (CN) et bulbe olfactif (BO) à l’arrière de la muqueuse et – **B.** et **C.** Photo de la muqueuse olfactive de rat en coupe sagittale et schéma représentatif de son organisation en 5 cornets.

## A. Organisation de la muqueuse olfactive

### 1) Anatomie de la MO

L’air inhalé transporte les molécules odorantes volatiles jusqu’à la MO qui tapisse la partie postérieure de la cavité nasale dont l’épithélium, qui repose sur la lame basale, est constitué de trois types de cellules : les cellules basales, les cellules de soutien et les neurones sensoriels olfactifs (NSO). Chez le rat, une coloration de la cytochrome c oxydase, dont l’intensité est corrélée à l’activité fonctionnelle neuronale, de ces différents types cellulaires a permis de mettre en évidence une organisation en six couches ([Pataramekin et Meisami, 2006](#)) (**Figure 3 A.**). La couche la plus profonde est composée des cellules basales horizontales (couche I), puis respectivement en remontant les couches une à une jusqu’à la surface de l’EO, nous trouvons ensuite des cellules basales globulaires et des NSO immatures (couche II), puis les corps cellulaires des NSO matures (couche III), puis les dendrites des NSO matures ainsi que la partie la plus volumineuse des cellules de soutien dont leurs noyaux (couche IV), puis toujours les dendrites des NSO matures ainsi que la partie apicale des cellules de soutien (couche V) et enfin les cils des NSO matures et les microvilli des cellules de soutien (couche VI). L’EO est donc qualifié de pseudo-stratifié.

La surface de l’EO est entièrement recouverte d’une substance visqueuse appelée mucus, dans laquelle les cils des neurones olfactifs baignent. Le mucus est sécrété par les glandes de Bowman, localisées au niveau du tissu conjonctif, sous l’EO. Il est constitué d’eau, d’ions et

de nombreuses protéines (Heydel et al, 2013). Les fonctions qui lui sont attribuées sont diverses. Il a été montré que le mucus contenait des enzymes à cytochrome P-450, il pourrait donc jouer un rôle de détoxification de la MO (Zupko et al, 1991). Les immunoglobulines qu'il contient lui confèreraient un rôle de défense immunitaire (Getchell et Getchell, 1991 ; Débat et al, 2007). Il permettrait aussi de concentrer puis d'éliminer les molécules odorantes de la MO (Getchell et al, 1984). De plus, le mucus contient des protéines appelées OBP pour Odorant Binding Protein, qui se lieraient aux odorants arrivant dans la cavité nasale et pourraient participer à leur solubilisation et interagir avec les récepteurs olfactifs présents sur les cils des neurones olfactifs (Briand et al, 2002 ; Heydel et al, 2013).

## 2) Neurones sensoriels olfactifs (NSO)

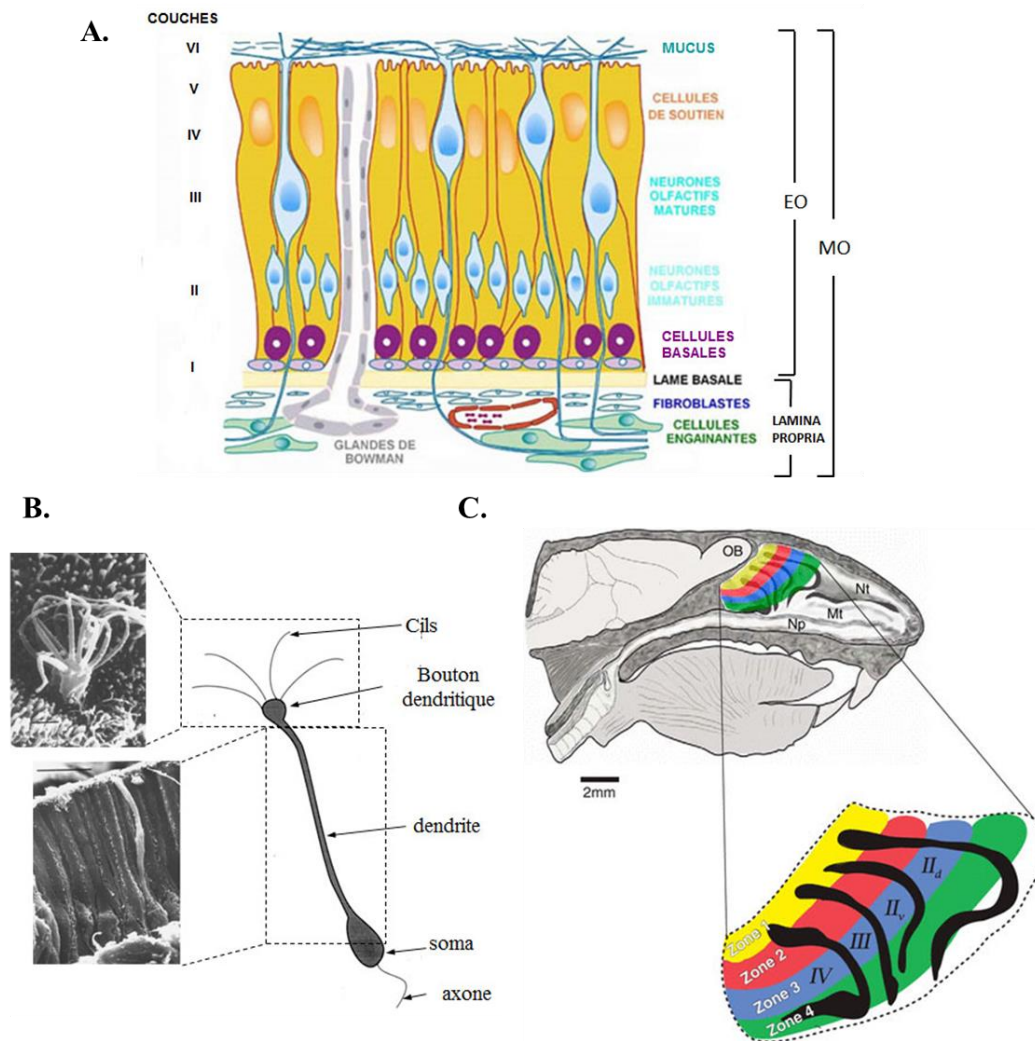
### a) Morphologie des NSOs

Les NSOs sont des cellules bipolaires avec un soma de petite taille (~6 µm x 13 µm). Du côté apical, une seule dendrite se termine par un bouton dendritique coiffé d'une dizaine de cils non motiles qui s'étendent sur plus de 50 µm à la surface de l'EO (**Figure 3 B.**). C'est au niveau de la membrane de ces cils que sont localisés les récepteurs des molécules odorantes, appelés récepteurs olfactifs (ROs). Les cils exprimant les ROs baignent dans le mucus qui recouvre la surface de l'EO et dans lequel les molécules odorantes présentes dans l'air inhalé vont être solubilisées, favorisant ainsi l'échange avec les ROs. Les stimuli olfactifs sont donc « captés » par les ROs des NSOs et l'information chimique est alors convertie en potentiels d'action.

### b) Gènes codant pour les ROs

Les gènes des ROs ont tout d'abord été découverts chez le rongeur par Buck et Axel en 1991. Ils forment la famille multigénique la plus vaste chez les mammifères et représentent près de 2% du génome. Chez la souris, il existe environ 1300 gènes de ROs, répartis en 27 clusters sur pratiquement tous les chromosomes à l'exception des chromosomes 12 et Y (Zhang et Firestein, 2002). L'Homme possède, lui, environ 900 gènes avec un plus grand pourcentage de pseudogènes : environ 60% contre 20% chez le rongeur (Godfrey et al, 2004 ; Malnic et al, 2004 ; Zhang et al, 2007 ; Olender et al, 2008). Ces pseudogènes sont des gènes ayant accumulé de petites délétions, des mutations ponctuelles, ou des décalages de cadre de lecture, qui empêchent l'expression d'une protéine fonctionnelle.

Différents travaux ont montré qu'un NSO mature n'exprime majoritairement qu'un seul RO, ou un petit nombre de ROs (Mombaerts et al, 1996a ; Ngai et al, 1993 ; Ressler et al, 1994 ; Strotmann et al, 1992 ; Zhang et Firestein, 2002) et que l'expression des ROs est temporelle, elle évolue en fonction de l'âge de l'individu (Margalit et al, 1993 ; Khan et al, 2013 ; Zhang et al, 2004). Les NSOs sont distribués dans quatre régions différentes de la muqueuse en fonction de la nature du RO qu'ils expriment (Ressler et al, 1993 ; Strotmann et al, 1994 ; Sullivan et al, 1995 ; Vassar et al, 1994), ces quatre zones, numérotées I, II, III et IV étant organisées de la partie dorso-médiane à la partie ventro-latérale de l'EO (Figure 3 C.). Et à l'intérieur de chaque zone, des centaines de différents types de NSOs sont mélangés.



**Figure 3 :** **A.** Organisation des différents types cellulaires de la MO – adapté de Palouzier-Paulignan et al, 2012 – **B.** Morphologie d'un neurone sensoriel olfactif – images de neurones sensoriels olfactifs humains prises au microscope électronique – image du bas : longs dendrites des NSO – échelle : 10  $\mu$ m – image du haut : surface de la MO avec vue sur un bouton dendritique avec 8 cils – échelle : 1 $\mu$ m - adapté de Schild et Restrepo, 1998 – **C.** Schéma d'organisation en 4 zones des NSOs dans l'EO chez la souris - adapté de Barber et Coppola, 2015.

### c) Structure des ROs

Les ROs constituent un large répertoire de protéines appartenant à la même sous-famille des récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) que la rhodopsine (RCPG activé par la lumière) du fait de certaines similarités structurales (Buck et Axel, 1991 ; Firestein, 2001 ; Mombaerts et al, 1999). Ce sont des protéines de petite taille (300 à 350 acides aminés). Ces récepteurs comportent 7 domaines transmembranaires (TM1 à TM7) reliés par trois boucles externes et trois boucles cytoplasmiques et comportant un domaine intracellulaire (C-terminal) au niveau du TM7, un domaine extracellulaire (N-terminal) au niveau du TM1 qui les distinguent des autres sous-familles de RCPG du fait de sa courte taille (20 à 30 acides aminés) (Bockaert et Pin, 1999). (Figure 4 A.). De plus, l'autre spécificité structurale des ROs vient de la seconde boucle extracellulaire particulièrement longue et portant une paire supplémentaire de cystéines ainsi que des séquences conservées non partagées par les autres RCPG (Mombaerts et al, 1999 ; Samsonova et al, 2007). La comparaison des séquences peptidiques de multiples RO de mammifères a par ailleurs permis de mettre en évidence un faible pourcentage d'homologie au niveau des domaines TM3 à TM7 et sur la deuxième boucle extracellulaire (Abaffy et al, 2007 ; Hall et al, 2004 ; Katada et al, 2005 ; Man et al, 2004), ce qui suggère que ces régions pourraient faire partie de la poche de liaison du ligand.

### d) Transduction du signal chimique en signal électrique

Les NSOs expriment la machinerie protéique de transduction du signal chimique qui va être activée après fixation d'un ligand odorant sur le RO présents au niveau de la membrane plasmique des cils, et qui va permettre la transformation du signal chimique en signal électrique qui va se propager le long de leurs axones et atteindre le cerveau.

La voie de transduction impliquant l'AMPC est la plus répandue dans la MO des mammifères (Figure 4 B.), c'est donc cette voie que nous allons détailler uniquement.

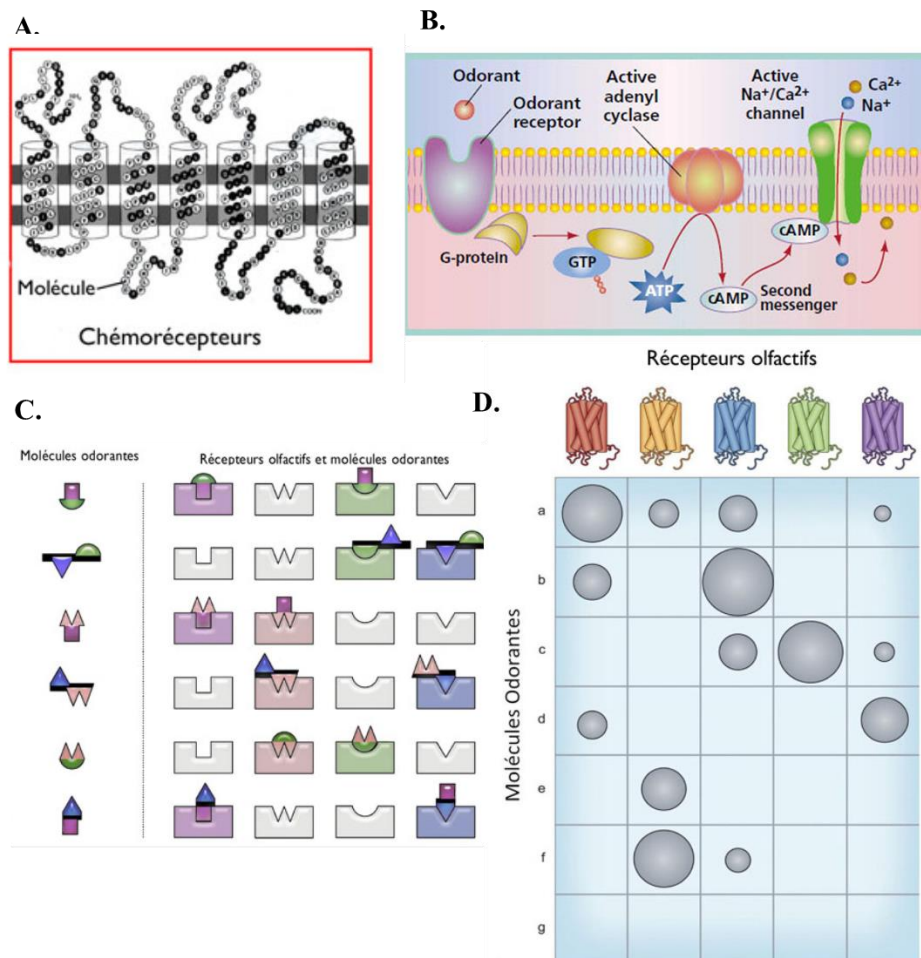
La fixation d'un ligand odorant à son RO déclenche une cascade de réactions qui commence par l'activation d'une protéine G hétérotrimérique composée d'une sous-unité  $\alpha$  nommée  $G_{olf}$  et d'un complexe  $\beta\gamma$  (Jones et Reed, 1989 ; Mombaerts, 1999), par phosphorylation. La sous-unité  $\alpha$  activée va alors se lier à du guanosine triphosphate (GTP) et se dissocier du complexe  $\beta\gamma$ . Elle va alors à son tour activer sélectivement une enzyme, l'Adénylyl Cyclase de type III (ACIII), qui va transformer l'adénosine triphosphate (ATP) en Adénosine 3', 5'-MonoPhosphate cyclique (AMPC). L'AMPC joue le rôle de second messenger : en concentration suffisante, il active l'ouverture des canaux ioniques, qui appartiennent à la

famille des canaux activables par les nucléotides cycliques (canaux CNGA<sub>2</sub>). L'activation de ces canaux par l'AMPc provoque l'entrée de cations, essentiellement des ions sodique Na<sup>+</sup> et calcique Ca<sup>2+</sup> (Nakamura et Gold, 1987). Ce passage de cations, d'autant plus important que le nombre de molécules odorantes liées aux RO est élevé, va dépolariser le NSO. Le Ca<sup>2+</sup> a très récemment été décrit comme jouant un rôle clé dans la médiation et la régulation de la réponse olfactive (Ferguson et Zhao, 2017). En effet, une augmentation de sa concentration dans le cil olfactif va provoquer l'ouverture de canaux chlore Cl<sup>-</sup>. Comme les NSOs accumulent du Cl<sup>-</sup>, l'ouverture des canaux Cl<sup>-</sup> va générer une sortie de Cl<sup>-</sup> qui va amplifier la dépolarisation du NSO. Si le seuil de dépolarisation est atteint, un potentiel d'action se propage tout au long de l'axone du NSO et provoque une libération de neurotransmetteur exciteur, du glutamate, dans les glomérules du bulbe olfactif (détails ci-dessous).

Des processus additionnels mettant en jeu la production de guanosine monophosphate cyclique (GMPc), d'inositol 1,4,5-triphosphate (IP3), de monoxyde de carbone, de monoxyde d'azote, peuvent également contribuer à la modulation des réponses (Zufall et Leinders-Zufall, 2000).

#### e) Codage combinatoire de l'information olfactive

La capacité discriminatoire du système olfactif des mammifères est telle que des milliers de produits chimiques volatils sont perçus comme ayant des odeurs distinctes. Un RO est capable de reconnaître de multiples composés odorants et un composé odorant peut être reconnu par de multiples ROs (Malnic et al, 1999). Compte tenu de la grande variété de ROs et d'odorants existants, cela permet un codage combinatoire complexe et quasi illimité (Figure 4 C. et D.) conférant à l'odorat une extraordinaire sélectivité et sensibilité. D'après une étude récente, l'Homme serait ainsi capable de discriminer plus de 10<sup>12</sup> odeurs (Bushdid et al, 2014).



**Figure 4 :** **A.** Schéma général d'un RCPG – **B.** Schéma résumant la transduction du signal chimique déclenchée par la fixation d'un ligand odorant sur son RO, en signal électrique au niveau de l'axone des NSOs - adapté de [Mombaerts, 2001](#) – **C.** Codage combinatoire des récepteurs olfactifs : les odorants se fixent aux RO par complémentarité de forme, un RO a de l'affinité pour plusieurs odorants, et un odorant peut se fixer sur différents RO, **D.** Tableau représentant les profils de reconnaissance de 5 RO mettant en évidence les différences d'affinité d'un récepteur pour différents odorants – adapté de [La compatibilité et le système olfactif - Philippe Roi, Tristan Girard, Jean-Daniel Forest, André Holley - La théorie Sensorielle 2013.](#)

### 3) Cellules de soutien ou cellules sustentaculaires

Les cellules de soutien, également appelées cellules sustentaculaires, représentent environ 15 à 25 % de la population totale de l'EO. Ce sont de grosses cellules bipolaires, de forme allongée, qui s'étirent de la lame basale jusqu'à la surface de l'EO, où elles se terminent par des microvilli, qui, tout comme les cils des NSOs, baignent dans le mucus ([Pixley et al, 1997](#)). Ces cellules ont été moins étudiées. On leur attribue néanmoins à la fois des fonctions similaires à des cellules épithéliales : sécrétion, ([Menco et Morrison, 2003](#)), endocytose ([Bannister et Dodson, 1992](#)) et métabolisme des produits toxiques ([Dahl, 1988](#) ; [Dooley et al, 2011](#)) et des cellules gliales : isolement physique et chimique des NSOs

(Breipohl et al, 1974), phagocytose des cellules mortes (Suzuki et al, 1996) et régulation de l'environnement ionique extracellulaire (Breipohl et al, 1974 ; Dooley et al, 2011 ; Getchell, 1986).

#### 4) Cellules basales

Deux types de cellules basales sont présents au niveau de l'EO : les cellules basales horizontales (CBHs), les plus profondes, en contact direct avec la lame basale, et les cellules basales globulaires (CBGs), plus volumineuses et plus superficielles. Ces cellules multipotentes montrent les mêmes caractéristiques que des cellules épithéliales : elles expriment des cytokératines, des filaments intermédiaires et des tonofilaments et sont capables de proliférer. Il a été montré *in vitro* que les CBHs avaient la capacité de se différencier en de multiples types cellulaires en culture (Carter et al, 2004). Ces cellules pourraient notamment se différencier en CBGs (Chen et al, 2014). Néanmoins, dans des circonstances normales, c'est-à-dire en absence de dommage particulier au niveau de l'EO, ces cellules sont mitotiquement au repos, et se divisent en moyenne tous les soixante jours. Elles serviraient de cellules progénitrices de réserve. Au contraire, les CBGs sont quant à elles mitotiquement actives (Beites et al, 2005 ; Chen et al, 2014 ; Guo et al, 2010) et se divisent en moyenne une fois par jour. Elles sont considérées comme les cellules progénitrices basales de l'EO. Sous le contrôle de différents facteurs de croissance, les CBGs pourraient se diviser en trois sous-populations : des cellules progénitrices multipotentes (CPMs), des cellules progénitrices transitoires (CPTs) et des précurseurs neuronaux intermédiaires (PNIs) (Schwob, 2002). Ces cellules subissent un renouvellement fonctionnel tout au long de leur vie, permettant une régénération constante des NSOs et des cellules de soutien (Beites et al, 2005 ; Brann et Firestein, 2014 ; Yu et Wu, 2016).

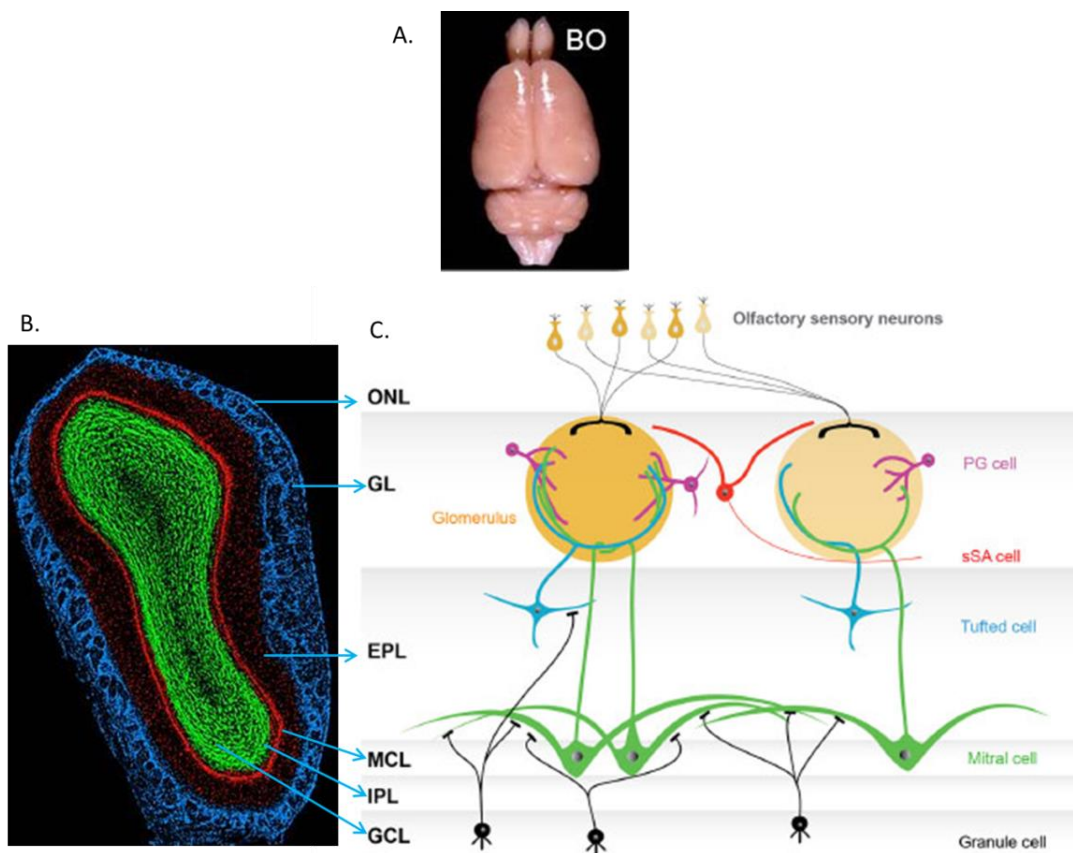
Un paragraphe sera consacré à la régénération de l'EO dans la suite du manuscrit.

### B. Organisation du bulbe olfactif

#### 1) Anatomie du bulbe olfactif

Le bulbe olfactif est le premier relai nerveux de l'information olfactive en provenance de la périphérie. Un premier traitement spatiotemporel de l'information y est effectué avant d'être transmis au cortex olfactif afin de donner une identité à la stimulation sensorielle qui a induit l'activation des ROs. Chez le rongeur, cette structure sphéroïde est la plus antérieure du cerveau (**Figure 5 A**). Dès la fin du XIXe siècle, la coloration de Golgi a permis de mettre en

évidence plusieurs types de neurones localisés dans les différentes couches du BO en fonction de leur morphologie (Figueres-Onate et al, 2014 ; Price et Powell, 1970 ; Pinching et Powell, 1971a). A partir de là, ces cellules ont donc conventionnellement été catégorisées en fonction de la couche dans laquelle est situé leur corps cellulaire. Le BO est donc structuré en six couches que nous décrirons brièvement de la couche la plus externe vers la couche la plus interne (Shepherd, *The synaptic organization of the brain*, 2004, Ed. 5, Oxford University Press.) (Figure 5 B. et C.).



**Figure 5** : Organisation des différentes couches cellulaires du BO – **A.** Bloc entier cerveau de rat avec les 2 bulbes olfactifs en partie antérieure – **B.** Sur une coupe de bulbe olfactif – adapté de Zou et al, 2009 – **C.** Sur un schéma – adapté de Nagayama et al, 2014 - ONL : olfactory nerve layer / couche du nerf olfactif, GL : glomerular layer / couche glomérulaire, EPL : external plexiform layer / couche plexiforme externe, MCL : mitral cell layer / couche des cellules mitrales, IPL : internal plexiform layer / couche plexiforme interne, GCL : granule cell layer / couche des cellules granulaires, PG cell : periglomerular cell / cellule périglomérulaire (représentée en violet), sSA cell : short axon cell / cellule à axone court (représentée en rouge), Tufted cell : cellule à panache (représentée en bleu), Mitral cell : cellule mitrale (représentée en vert), Granule cell : cellule granulaire (représentée en noir).



## a) Les différentes couches du bulbe olfactif

- **Couche du nerf olfactif (Olfactory nerve layer, ONL)**

La couche du nerf olfactif est la couche la plus superficielle (**Figure 5 C.**). Elle est formée par les axones des NSOs qui parcourent la surface du BO, empaquetés par des cellules engainantes, avant de pénétrer et de se ramifier dans la couche glomérulaire où ils contactent leurs cibles cellulaires.

- **Couche glomérulaire (Glomerular layer, GL)**

Cette couche est formée de structures périphériques d'une centaine de micromètres appelés glomérules (**Figure 5 C.**). Ces glomérules sont entourés de corps cellulaires et abritent un neuropile. Un neuropile, est quant à lui, un regroupement de nombreuses fibres nerveuses issues des NSOs et des différents types cellulaires du BO qui rentrent en contact pour former entre elles des synapses ([Pinching et Powell, 1971b](#)).

Cette couche est très dense et riche en terme de contacts dendritiques : elle reçoit des afférences de plusieurs dizaines de milliers de terminaisons axonales des NSOs auxquelles font face une centaine de dendrites apicales de cellules de sortie du BO (cellules mitrales et cellules à panache). L'ensemble est entouré de nombreuses cellules juxtaglomérulaires et d'astrocytes.

- **Couche plexiforme externe (External plexiform layer, EPL)**

La couche plexiforme externe contient les corps cellulaires des cellules à panache et un réseau d'arbres dendritiques dense provenant des cellules à panache, des cellules mitrales, et des cellules granulaires (**Figure 5 C.**).

- **Couche des cellules mitrales (Mitral cell layer, MCL)**

La couche des cellules mitrales (MC) est une couche monocellulaire fine composée des somas des cellules du même nom (**Figure 5 C.**). Les cellules mitrales sont les cellules de sortie du BO, elles émettent un axone myélinisé en direction de diverses structures plus centrales. Le corps cellulaire de ces cellules a un diamètre moyen de 30 à 40 µm chez le rat et elles sont au nombre d'environ 40 000.

- **Couche plexiforme interne (Internal plexiform layer, IPL)**

La couche plexiforme interne (IPL) est le lieu de passage de nombreuses fibres, axones des neurones de sortie et dendrites des cellules granulaires (**Figure 5 C.**).

- **Couche des cellules granulaires (Granule cell layer, GCL)**

La couche des cellules granulaires contient le soma des cellules du même nom. C'est la couche la plus dense en corps cellulaire du BO. Les cellules granulaires qui la composent sont les principaux interneurons inhibiteurs du BO. Ces cellules n'ont pas d'axone et émettent leur dendrite vers l'EPL où elles forment de nombreuses épines dendritiques, qui sont le lieu des synapses réciproques avec les dendrites secondaires des cellules mitrales (**Figure 5 C.**).

## **b) Les différents types cellulaires du bulbe olfactif**

Les différents types cellulaires du BO ont été relativement bien décrits dans la littérature ([Kosaka & Kosaka, 2011](#) ; [Egger & Urban, 2006](#) ; [Nagayama et al, 2014](#) ; [Wachowiak & Shipley, 2006](#)).

- **Les cellules juxtaglomérulaires (Juxtaglomerular cell, JC)**

Ce sont les somas des cellules juxtaglomérulaires qui entourent les glomérules qui constituent la GL (**Figure 5 C.**). Ces neurones sont principalement de 3 types, qui diffèrent entre eux non seulement par leur morphologie mais aussi par leurs caractères physiologiques, incluant propriétés intrinsèques et extrinsèques :

- **les cellules cellules périglomérulaires (Periglomerular cell, PG)** entourent le neuropile qui est le cœur du glomérule et font la liaison entre plusieurs glomérules adjacents. On en distingue plusieurs sous-types qui diffèrent par leur morphologie, leurs connexions synaptiques et le type de neurotransmetteur et de neuromodulateur libéré ([Ying et al, 2012](#)). La majorité de ces cellules (80%) reçoit une entrée synaptique des cellules à panache externe et seulement 20 % sont contactées par les axones des NSOs. Elles ont une action inhibitrice et contactent d'une part les dendrites des cellules mitrales et des cellules à panache et d'autre part les autres interneurons glomérulaires dont elles régulent l'activité.

- **les cellules à panache externes (External tufted cell, ET)** sont des cellules excitatrices qui envoient leurs dendrites primaires à l'intérieur des glomérules où elles reçoivent une entrée monosynaptique de l'axone des NSOs. A ce niveau, elles forment également des synapses excitatrices avec les projections des autres types cellulaires dans les glomérules. Ces cellules ne possèdent pas de dendrites secondaires et leur axone, dont la cible n'est pas connue, traverse l'EPL vers le noyau olfactif antérieur.

- **les cellules à axone court (Short axon cell, sSA)** ont leurs dendrites qui émettent des prolongements et reçoivent une entrée des cellules à panache externe. Contrairement à ce que suggère leur appellation, leur axone est long, ramifié et traverse plusieurs glomérules : ils activent les cellules périglomérulaires des glomérules adjacents ([Aungst et al, 2003](#)).

- **Les neurones de sortie : cellules mitrales et à panache**

Il en existe deux types en nombre comparable : les cellules à panache (tufted cell, TC) dont les corps cellulaires se trouvent dans la couche plexiforme externe et les cellules mitrales (mitral cells, MC) dont les corps cellulaires se trouvent dans la couche du même nom (**Figure 5 C.**). Ces cellules émettent une seule dendrite primaire qui va innervier un seul glomérule. A ce niveau, elles reçoivent une entrée monosynaptique des axones des NSOs et forment des synapses avec les interneurons de la couche glomérulaire. Elles émettent aussi 2 à 9 dendrites secondaires qui sont présents dans l'EPL et qui font synapse avec les dendrites des cellules granulaires. Leur axone sort du BO pour se projeter dans le cortex olfactif.

- **Les cellules granulaires**

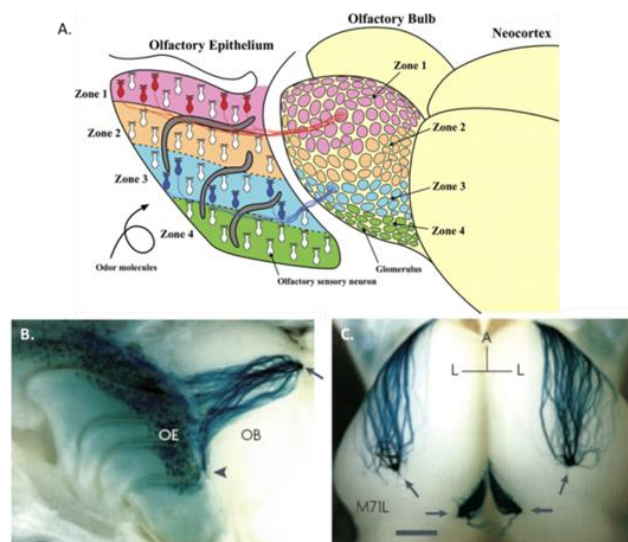
Ce sont les neurones les plus nombreux du BO. Principalement GABAergiques, ces cellules de petite taille (8-10 µm de diamètre), dépourvues d'axone, émettent des dendrites qui forment des synapses réciproques avec les neurones de sortie dans l'EPL (**Figure 5 C.**).

- **Les astrocytes**

Ils sont présents dans toutes les couches du BO et plus particulièrement dans les glomérules. Leurs corps cellulaires entourent le neuropile glomérulaire ([Bailey & Shipley, 1993](#) ; [Chao et al, 1997](#)). Ces cellules gliales assurent la régulation de la quantité de glutamate dans les synapses ([Isaacson, 1999](#)) et l'approvisionnement en énergie dans les glomérules ([Coppersmith & Léon, 1984](#)). Ils exercent en plus un contrôle sur l'activité hémodynamique et synaptique dans le glomérule ([Chaigneau et al, 2003 et 2007](#) ; [Petzold et al, 2008](#)).

## 2) Projections axonales et glomérules du BO

Les NSOs exprimant le même type de RO, dispersés dans 4 zones distinctes de l'EO en fonction du RO qu'ils expriment (Cf paragraphe partie III. A. 2) b) de ce chapitre), envoient leur axone non myélinisé à travers la lame basale vers un ou deux mêmes glomérules, ce qui permet l'élaboration de carte d'activation des glomérules en fonction des RO exprimés pour un odorant donné (**Figure 6**). Ces projections sont symétriques entre les deux bulbes et reproductibles entre individus d'une même espèce ([Mombaerts et al, 1996a et 2006](#) ; [Ressler et al, 1994](#) ; [Vassar et al, 1994](#) ; [Zou et al, 2009](#)). Des mutations ou des substitutions de bases dans la région codante du RO entraîne un changement des sites de projection dans le BO ([Wang et al, 1998](#) ; [Ishii et al, 2001](#)). L'expression des ROs au niveau des axones a donc un rôle important dans la sélection de la zone de projection dans le BO. Chez la souris, un BO contient environ 1800 glomérules ([Royet et al, 1988](#)) et chaque glomérule reçoit les axones de 1000 à 2000 NSOs ([Ressler et al, 1994](#)). Il a aussi été récemment montré qu'il y avait une corrélation entre la taille des glomérules et le nombre de NSOs exprimant le même RO dans la MO ([Bressel et al, 2016](#)). Ainsi, plus la taille d'un glomérule est important et plus il y a de NSOs exprimant le même RO dans la MO et inversement.



**Figure 6** : Projections axonales des NSOs exprimant le même RO - **A.** Schéma d'organisation en 4 zones des NSOs dans la MO et de leurs projections axonales au niveau des glomérules du BO - adapté de [Mori et al, 2006](#) - **B.** Image prise à partir d'un bloc entier contenant la MO et BO d'une souris – les NSOs co-exprimant le RO M71 et le marqueur lacZ sont colorés en bleu – les axones provenant des NSOs répartis dans la zone I de l'EO entrent dans le bulbe à travers la lame criblée (indiquée par une flèche) où ils convergent en un glomérule d'environ 50  $\mu\text{m}$  de diamètre (indiqué par une flèche) - **C.** Vue du dessus des 4 glomérules formés par les axones des NSOs exprimant M71 (indiqués par des flèches), barre d'échelle = 500  $\mu\text{m}$  – adapté de [Feinstein et Mombaerts, 2004](#).

### 3) Transmission synaptique au niveau des glomérules

Au niveau du BO, un glomérule est composé d'un neuropile, entouré par un ensemble de neurones juxtagloméculaires et d'astrocytes. Le neuropile est le siège des contacts synaptiques qui ont lieu entre les axones des NSOs, les dendrites apicaux des cellules mitrales et à panache, et les dendrites des neurones juxtagloméculaires.

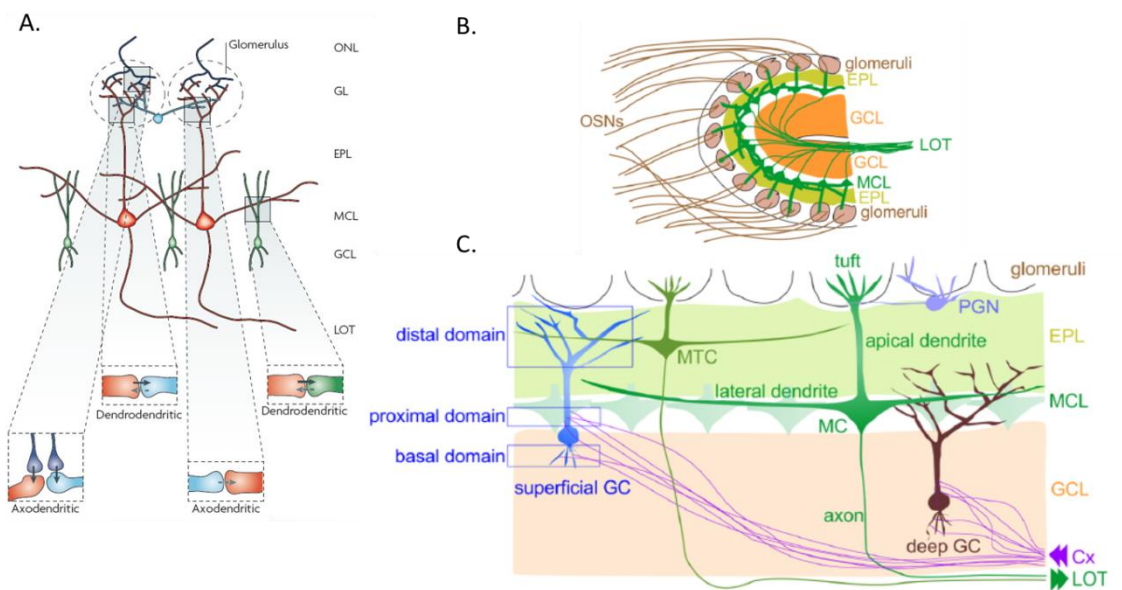
Trois types de synapses de base sont présents au niveau du neuropile (**Figure 7 A.**) : des synapses axodendritiques qui relient les axones des NSOs aux dendrites des cellules mitrales et périgloméculaires, des synapses dendrodendritiques réciproques entre les dendrites des cellules mitrales et des périgloméculaires, fournissant une seconde source d'entrée pour les périgloméculaires, et des synapses axodendritiques inhibitrices reliant les axones des périgloméculaires aux dendrites des cellules mitrales, qui servent de médiateur à la rétroaction ou à l'inhibition anticipée.

De plus, dans la couche plexiforme externe se trouvent des synapses dendrodendritiques réciproques entre les dendrites des cellules mitrales et les dendrites des cellules granulaires, qui joueraient un rôle crucial dans le contrôle des sorties des cellules mitrales ([Zou et al, 2009](#)).

Après l'arrivée de l'influx nerveux transmis par les NSOs aux glomérules, les terminaisons axonales de ces neurones libèrent du glutamate dans la fente synaptique. A noter que les NSOs forment uniquement des synapses excitatrices. Le glutamate active les récepteurs glutamatergiques ionotropiques de type AMPA et NMDA présents au niveau des dendrites des cellules mitrales et à panache ainsi que sur les dendrites des différents types de cellules périgloméculaires ([Aroniadou-Anderjaska et al, 1999](#)) (**Figure 7 B. et C.**). Les cellules périgloméculaires vont alors intervenir dans la régulation de l'activité intragloméculaire en libérant de la dopamine et du GABA, dont les récepteurs sont présents au niveau des NSOs ([Aroniadou-Anderjaska et al, 2000](#) ; [Ennis et al, 2001](#) ; [Hsia et al, 1999](#)). A la sortie du BO, l'activation des cellules mitrales et à panache induit une dépolarisation qui est transmise le long de leur dendrite primaire ([Bischofberger & Jonas, 1997](#) ; [Debarbieux et al, 2003](#)). Un potentiel d'action naît alors au niveau somato-axonal et se propage le long des axones des cellules mitrales et à panache vers le cortex, mais aussi le long de leurs dendrites secondaires qui contactent les épines dendritiques des cellules granulaires dans les synapses dendrodendritiques réciproques (**Figure 7 B. et C.**). A ce niveau une libération de glutamate par les cellules mitrales et à panache active les récepteurs NMDA sur les cellules granulaires

qui répondent par une libération de GABA inhibiteur qui sollicite les récepteurs GABA sur les cellules mitrales et à panache ([Wisden et al, 1992](#) ; [Nicoll, 1971](#)).

Pour résumer, chaque famille de NSOs exprimant le même RO est connectée à un nombre très limité de glomérules olfactifs (1 à 2 parmi les 1800 présents en moyenne par BO). Ces glomérules transmettent l'information aux couches profondes du BO par l'intermédiaire des dendrites primaires des cellules mitrales et à panache, qui interagissent via leurs dendrites secondaires avec les épines des cellules granulaires dans l'EPL. L'odeur induit donc une représentation spatiale au niveau de la couche glomérulaire en recrutant un panel de glomérules, tout en modifiant la dynamique de l'activité des couches profondes par des interactions entre cellules mitrales et à panache et cellules granulaires. L'ensemble de ces activités définit le codage spatiotemporel des odeurs. Les cellules mitrales et à panache envoient alors le message au cortex olfactif et au système limbique sans relais ou filtre thalamique.



**Figure 7 :** **A.** Architecture synaptique d'un glomérule – les axones des NSOs (représentées en bleu foncé) entrent dans le glomérule – Les glomérules sont entourés par des cellules gliales (non représentées) et par des cellules périglomérulaires PG (représentées en bleu clair) qui étendent leurs neurites vers plusieurs glomérules périphériques – chaque cellule mitrale (représentée en rouge) innerve un seul glomérule avec ses dendrites apicales et étend également des dendrites latérales autour du BO pour former des synapses avec une population d'interneurone, les cellules granulaires (représentées en vert) – les cellules mitrales projettent leur axone vers le cortex piriforme, zone du traitement olfactif supérieur - 3 types de synapses de base au niveau du neuropile glomérulaire du BO – adapté de [Zou et al, 2009](#), **B.** et **C.** Organisation du BO – **B.** Les NSOs (en marron) projettent leurs axones vers les glomérules et entrent en contact avec les cellules mitrales et à panache (en vert) qui envoient leurs axones vers le tractus olfactif latéral (lateral olfactory tract, LOT) – **C.** les cellules mitrales (MC – en vert kaki) et à panache (MTC en vert foncé) envoient leurs dendrites latérales en profondeur et à la surface de l'EPL, respectivement. Les 2 principaux types d'interneurones sont les cellules périglomérulaires et les cellules granulaires – adapté de [Ravi et al, 2016](#).

## **IV. Développement fœtal du système olfactif chez le rongeur et l'humain**

Dans cette partie, je décrirai uniquement le développement de l'EO, du nerf olfactif et l'apparition des glomérules au cours des différents stades embryonnaires chez le rongeur (souris et rat) car l'ensemble des travaux de thèse ont été réalisés chez la souris. Je ne consacrerai que quelques lignes pour décrire très brièvement le développement du système olfactif chez l'humain afin de mieux comprendre les chapitres II et III de l'introduction où je serai amenée à faire des comparaisons avec ce modèle.

### **A. Développement fœtal de la muqueuse olfactive chez le rongeur**

Le système olfactif est un des systèmes sensoriels qui se développe le plus précocement chez l'embryon. Chez la souris, la placode olfactive, qui va donner naissance à l'EO, apparaît comme un épaissement ectodermique au niveau de la région rostro-latérale de la tête et est visible dès le neuvième jour de la vie embryonnaire (E9) ([Cuschieri et Bannister, 1975a et 1975b](#) ; [Suarez et al, 2012](#)). Cette placode olfactive va progressivement s'épaissir et s'invaginer pour former dès E10 les puits nasaux, qui donneront finalement les narines à partir de E11 ([Treloar et al, 2010](#)).

L'apparition des différents types cellulaires constituant l'EO se fait progressivement après induction de la formation de la placode olfactive, très probablement à partir de progéniteurs communs qui seraient les cellules globulaires basales (CBGs) ([Nicolay et al, 2006](#)). Chez le rongeur, les premiers signes de différenciation cellulaire sont observés à partir de E10, avec l'apparition de deux types de cellules : des cellules de coloration foncée, qui sont des cellules souches embryonnaires et des cellules de coloration claire qui sont des NSOs en cours de développement ([Smart, 1971](#)) (**Figure 8 A.**). Des homéogènes et de nombreux facteurs de transcription vont jouer un rôle crucial au niveau de la division des cellules souches basales. Ils vont s'exprimer de façon coordonnée et permettre l'apparition progressive des différents types cellulaires de la MO. Ainsi des cellules progénitrices à l'origine des NSOs, des cellules non neuronales et des cellules engainantes, exprimant Pax7, un facteur de transcription exprimé dans de nombreux tissus pendant les stades embryonnaires précoces et connu pour jouer un rôle dans le développement de l'EO, ont également été mises en évidence entre E10.5 et E15.5 ([Murdoch et al, 2010](#)). A ce stade, l'EO n'est pas encore organisé en 3 couches comme chez l'adulte et les corps cellulaires des cellules souches

embryonnaires s'étendent de la partie basale à la partie apicale. Ainsi, à E11, la partie apicale de l'EO est composée à 95% des cellules progénitrices (Smart, 1971). Les premières différenciations cellulaires aboutissent à des NSOs immatures puis matures dès ce stade, à partir de E10 (Ikeda et al, 2010). Chez la souris, à partir de E12, les premiers boutons dendritiques exprimant des ROs apparaissent en partie apicale de l'EO et les premiers cils olfactifs apparaissent quant à eux à E13 (Schwarzenbacher et al, 2005). La stratification de l'EO en trois couches commence à se mettre en place à partir de E13,5-E14,5 avec l'apparition progressive des autres types cellulaires différenciés constituant l'EO, comme les cellules basales et les cellules de soutien (Smart, 1971). Le nombre de NSOs augmente quant à lui progressivement au cours du développement à partir de E10,5 (Murdoch et al, 2010).

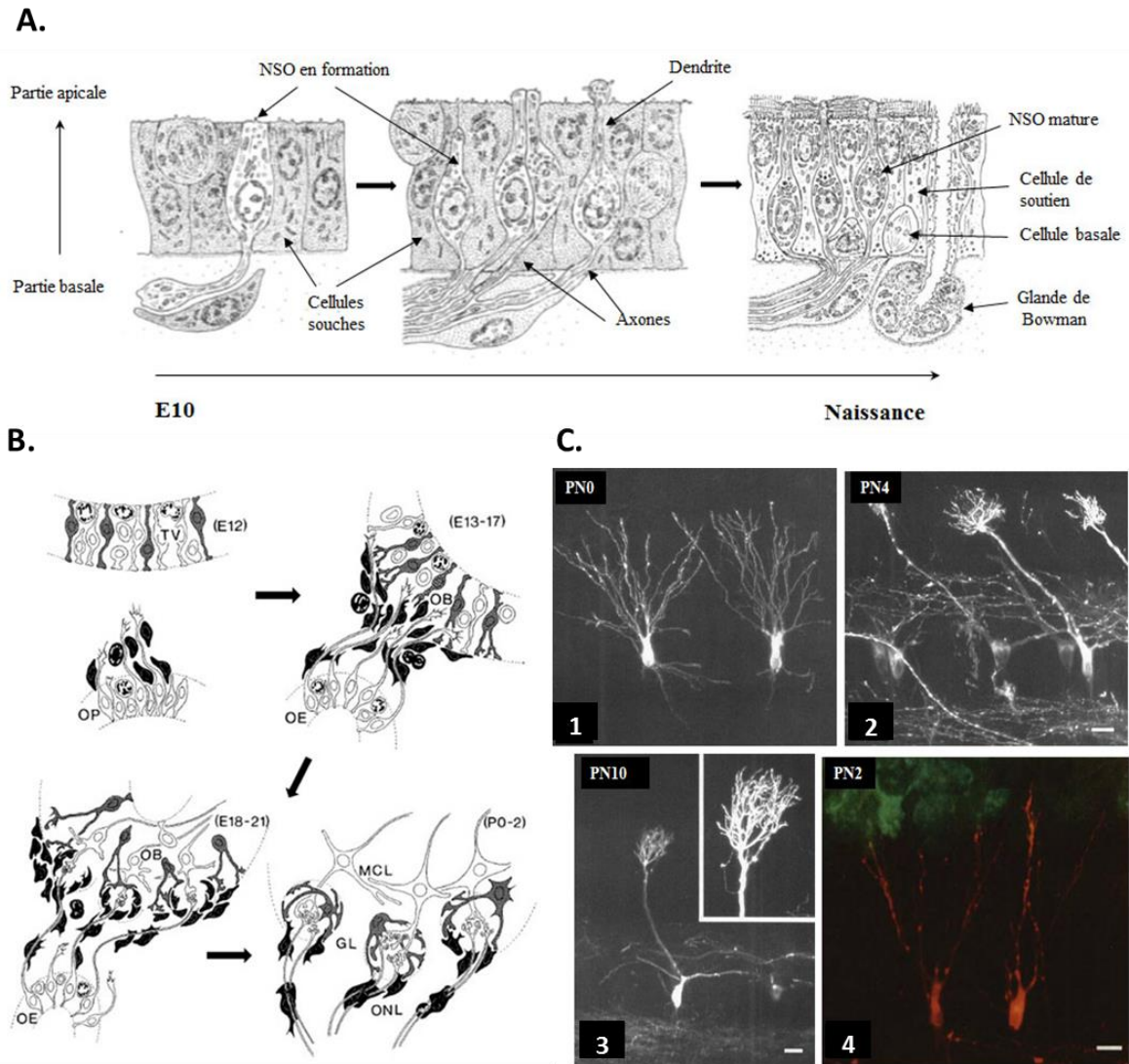
## **B. Développement fœtal du nerf olfactif et apparition des glomérules chez le rongeur**

Peu après leur différenciation, les NSOs vont étendre leurs axones hors de la zone de la MO, en passant à travers le tissu mésenchyme jusqu'à une zone précise située au niveau de l'ébauche de la vésicule télencéphalique, où le BO va ensuite se développer. Contrairement à l'EO qui se développe à partir de la placode olfactive, le BO lui va se développer à partir du tube neural. Les axones des NSOs ne vont pas migrer seuls. En effet une population de cellules migratoires quitte la placode olfactive et migre avec les axones, formant une accumulation d'axones et de cellules, appelée la masse migratoire (Valverde et al, 1992). Cette masse migratoire a été observée chez le rat, au microscope électronique, dès E12 (Valverde et al, 1992) et chez la souris entre E11 et E16 (Conzelmann et al, 2002). La nature de ces cellules migratoires est multiple. Elle serait composée de différents types cellulaires, incluant des précurseurs des cellules engainantes du nerf olfactif et de la couche du nerf olfactif du BO adulte (Valverde et al, 1992), des cellules exprimant les hormones de libération des gonadotrophines GNRH et LHRH qui migreront par la suite vers d'autres zones du cerveau (Schwanzel-Fukuda et Pfaff, 1989 ; Valverde et al, 1993 ; De Carlos et al, 1995) et des cellules exprimant l'Olfactory Marker Protein (OMP), marqueur caractéristique des NSOs matures (Valverde et al, 1993 ; Conzelmann et al, 2002). Ces cellules non neuronales, de type épithélial, sont positionnées le long des voies axonales durant toute la migration des axones des NSOs et participeraient à leur guidage. Grâce à des divisions mitotiques qui ont lieu au cours de la migration, leur nombre augmente considérablement entre E12 et E18. Il a été montré dans divers travaux que les ROs sont exprimés dans les axones des NSOs (Barnea et



al, 2004 ; Strotmann et al, 2004 ; Imai et Sakano, 2007) et que ces ROs joueraient un rôle de guidage vers les glomérules (Wang et al, 1998 ; Feinstein et Mombaerts, 2004). Et contrairement aux NSOs matures, qui selon l'hypothèse « un neurone olfactif - un récepteur olfactif » (Mombaerts, 2004) n'exprimerait majoritairement qu'un RO, les NSOs immatures, au cours du développement, pourraient quant à eux exprimer temporairement plusieurs ROs, qui seront éliminés au cours de la maturation pour finalement n'en exprimer plus qu'un (Mombaerts 2004 ; Tan et al, 2015). Il a également été montré que les cellules migratoires exprimant l'OMP exprimeraient également des ROs (Saito et al, 1998 ; Conzelmann et al, 2002). Chaque population de cellules exprimant un RO donné serait spécialement associée aux axones des NSOs exprimant le même récepteur et les guiderait vers une position précise pendant le développement du BO. Les premiers contacts synaptiques entre axones et dendrites au niveau de l'ébauche du BO ont été observés entre E17 et E18 chez le rat (Treloar et al, 1999 ; Valverde et al, 1992). La formation des glomérules est ensuite initiée par la pénétration des cellules de la masse migratoire dans la future couche glomérulaire entre E20 et PN0. Ces cellules vont venir entourer les zones où l'on trouve une forte densité de synapses, formant ainsi les protoglomérules (**Figure 8 B.**).

Jusqu'à E21, ni les cellules mitrales et à panache, ni les astrocytes du BO ne sont associés à ces protoglomérules. La maturation de ces glomérules en formation va donc se poursuivre pendant la période postnatale. Malun et Brunjes, en effectuant des observations au microscope confocal sur des coupes de BO de rat ont ainsi pu montrer que l'innervation des glomérules par les cellules mitrales va se développer après la naissance. Ainsi, entre PNO et PN2, la plupart des cellules mitrales présentent de nombreuses dendrites de diamètre et de forme uniforme (Malun et Brunjes, 1996) (**Figure 8 C. 1**). A ce même stade, les axones des NSOs ont fusionné pour former des neuropiles (**Figure 8 C. 4** - marquage vert) et les cellules mitrales vont venir innover plusieurs glomérules adjacents (**Figure 8 C. 4** - marquage rouge). Puis entre PN4 et PN10, les cellules mitrales vont adopter une morphologie plus mature caractérisée par une dendrite primaire découlant du soma et se terminant par une touffe de dendrites secondaires (**Figure 8 C. 2 et 3**).



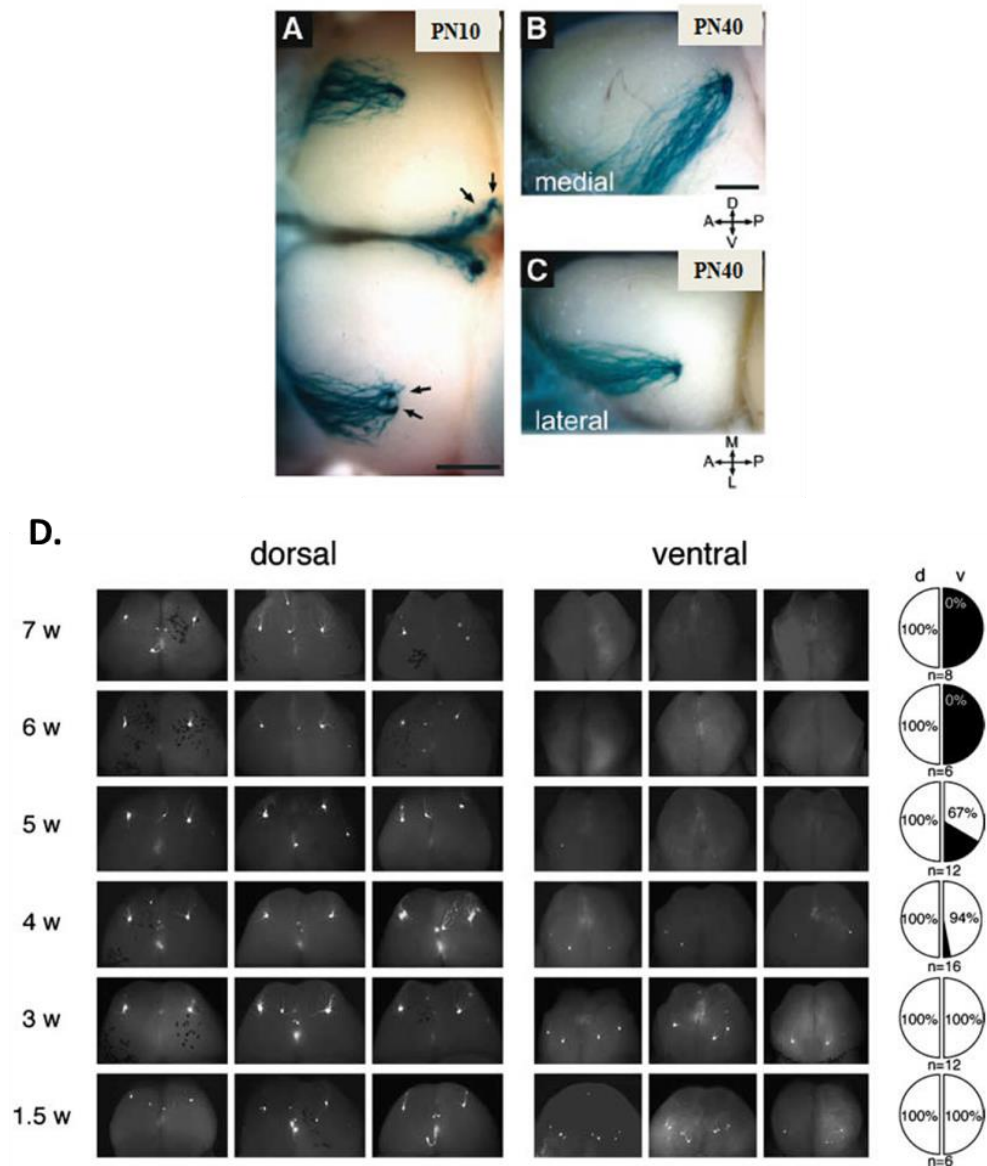
**Figure 8 :** **A.** Schéma résumant la mise en place des différents types cellulaires de l'EO chez la souris entre E10 et la naissance – dès E10 présence de 2 types de cellules, foncées et claires correspondant respectivement à des cellules souches embryonnaires et des NSOs en formation – adapté de [Cuschieri et al, 1975b](#) – **B.** Schéma résumant les différentes étapes de la formation des glomérules chez le rat entre E12 et P0-2 – les cellules migratoires sont représentées en noir, les cellules gliales en gris et les neurones en blanc – abréviations : GL : couche glomérulaire, MCL : couche des cellules mitrales, OB : bulbe olfactif, OE : épithélium olfactif, ONL : couche du nerf olfactif, OP : Placode olfactive, TV : vésicule télencéphalique – adapté de [Valverde et al, 1992](#) – **C.** Microphotographies confocales de bulbes olfactifs de rat à différents stades du développement - Barre d'échelle = 20 µm – adapté de [Malun et Brunjes, 1996](#).

Puis, la cinétique de maturation des glomérules va également dépendre de la cinétique d'expression des ROs dans la MO et du RO ([Zhang et al, 2004](#)). Une étude utilisant deux lignées de souris transgéniques différentes, la lignée M-71-IRES-taulacZ et la lignée M-72-IRES-taulacZ, dont les récepteurs olfactifs M71 ou M72 sont couplés à l'expression de lacZ, a

montré que la formation des glomérules M71 et M72 se précise après la naissance (Zou et al, 2004). A PN0, les axones M71 et M72 ont atteint 2 zones conservées : médiane et latérale, dans la partie postéro-dorsale de chaque BO mais ces axones sont très largement éparpillés et les glomérules M71 et M72 ne sont pas encore visibles. Puis à PN10, ces glomérules sont identifiables, mais sont de petite taille, en nombre multiple dans les 2 zones médiane et latérale de chaque BO (**Figure 9 A.**). De plus, ces glomérules multiples seraient innervés non seulement par les axones M71 ou M72 mais également par les axones de NSOs exprimant d'autres ORs. Sachant qu'un glomérule mature n'est innervé que par les axones des NSOs exprimant le même récepteur (Treloar et al, 2002), ces glomérules multiples seraient donc sous une forme transitoire immature. Enfin, à un âge supérieur à PN40, les glomérules M71 et M72 passent sous forme unique, avec une taille plus importante que les glomérules multiples immatures et ils ne sont alors innervés plus que par les axones M71 ou M72, laissant ainsi supposer qu'ils sont arrivés à maturité (**Figure 9 B. et C.**). A noter que cette maturité est atteinte à des âges différents en fonction du RO exprimé (Zou et al, 2004).

L'expression temporelle différentielle des ROs va donc conditionner la maturation et la structuration des glomérules et la présence d'un glomérule donné dans le BO est le témoin direct de l'expression d'un RO.

Une étude menée sur une autre lignée de souris, exprimant le RO transgénique MOR29A (TgMOR29A) couplé à l'expression de la GFP, a permis de montrer une maturation différente des glomérules ectopiques innervés par les NSOs exprimant TgMOR29A par rapport aux glomérules M71 et M72. En effet, chez des souris de 3 semaines, les glomérules ectopiques TgMOR29A ont été localisés en partie ventrale et dorsale de chaque bulbe, en nombre multiple au niveau des 2 zones (Nakatani et al, 2003). L'observation de ces glomérules chez des souris à différents stades du développement postnatal a révélé une disparition progressive des glomérules ectopiques TgMO29A situés en partie ventrale du BO alors que la structuration des glomérules ectopiques TgMOR29A situés en partie dorsale du BO reste inchangée (**Figure 9 D.**).



**Figure 9** : Maturation des glomérules M71 et M2 – **A. à C.** Exemples de glomérules M72 imagés à partir de blocs entiers de BO après une coloration X-gal – **A.** les flèches montrent les glomérules multiples chez le souriceau à PN10 au niveau des 2 zones médiane et latérale – **B.** et **C.** glomérule unique en zone médiane et latérale – barre d'échelle = 0.5 mm - adapté de [Zou et al, 2004](#) - **D.** Elimination progressive des sites de projections ectopiques des axones des NSOs exprimant TgMOR29A au niveau de la partie ventrale du BO au cours du développement postnatal – adapté de [Nakatani et al, 2003](#).

La maturation des glomérules semble donc se poursuivre au cours du développement postnatal. Cette maturation peut prendre différentes formes en fonction du RO exprimé par les axones des NSOs innervant le glomérule : soit le passage de glomérules multiples à un glomérule unique dans une même zone du bulbe, soit la disparition totale des glomérules dans une partie du bulbe. D'après Nakatani et ses collaborateurs, cette disparition totale pourrait

s'expliquer par un échec des connections avec les cellules à panache externe (Lodovichi et al, 2003).

Pour résumer, chez le rongeur, la mise en place de la carte topographique des projections axonales se fait pendant la période périnatale (Mombaerts et al, 1996 ; Royal et Key, 1999). A partir de E17, les NSOs exprimant le même RO convergent vers le même glomérule (Mombaerts et al, 1996 ; Royal et Key, 1999 ; Potter et al, 2001). Au niveau de la MO, la neurogénèse va atteindre un pic vers PN14 puis diminuer progressivement pour arriver à un rythme de base après le sevrage à PN21 afin d'effectuer la régénération des NSOs (Mackay-Sim et Kittel, 1991). Deux études récentes montrent qu'il y aurait une période critique au cours du développement pendant laquelle la carte de convergence axonale se met en place (Ma et al, 2014 ; Tan et al, 2015). Les NSOs formés pendant la période périnatale seraient responsables de l'établissement de la carte de convergences des projections axonales alors que les NSOs formés plus tard se connectent aux glomérules par interaction homotypique entre neurones exprimant le même récepteur olfactif selon la carte de convergence établie en périnatale.

### **C. Développement fœtal du système olfactif chez l'humain**

Pour ce qui est du développement du système olfactif principal chez l'humain, il a été montré que dès la 6-7<sup>e</sup> semaine de gestation, une ébauche des NSOs était observable en microscopie électronique et que ces neurones prenaient une apparence fonctionnelle de neurone cilié mature dès la 11<sup>e</sup> semaine (Pyatkina, 1982). La maturité de ces neurones a pu être mise en évidence avec l'observation de l'expression de l'OMP, marqueur spécifique des neurones olfactifs matures. Ainsi, il a été montré que l'OMP est exprimée dans le soma et les dendrites des NSOs de l'EO entre E29 et E32 semaines, et au niveau des projections innervant la couche glomérulaire du BO entre E33 et E35 semaines (Chuah et Zheng, 1987). En supposant que l'expression de l'OMP démontre la fonction de maturité des NSOs chez le fœtus humain, on pourrait en déduire que la capacité de détection olfactive devrait être effective dès la semaine E29. Le bulbe olfactif commence quant à lui à se différencier vers 6-8 semaines et prend sa structure laminaire caractéristique dès E18 semaines (Schaal, 1997).

### **V. Renouvellement et régénération de la MO et des projections axonales**

Les différents types cellulaires composant l'EO, du fait de leur localisation en périphérie à l'interface avec l'air, sont constamment soumis à des agressions extérieures, telle que l'exposition à des molécules chimiques toxiques ou des infections pouvant induire des inflammations, ce qui peut les endommager et provoquer leur mort. Une des caractéristiques originale du système olfactif par rapport aux autres tissus de l'organisme est que l'EO possède une capacité de renouvellement et de régénération importantes. Cette régénération se produit tout au long de la vie de l'organisme de façon naturelle pour renouveler les différents types cellulaires ou en réponse à une agression extérieure. Il a ainsi été montré chez le rat adulte qu'après une destruction massive de l'EO après une exposition au méthyl bromide, la restauration de l'épithélium était complète 6 à 8 semaines après l'exposition et ce malgré la sévérité de la lésion (95% de l'EO détruit) (Schwob, 2005) et que la restauration était suffisamment précise pour que la distribution de l'expression des ROs au sein de l'EO soit conservée (Iwema et al, 2004). De plus, les projections axonales de l'EO vers le bulbe sont entièrement restaurées 8 semaines après l'exposition (Schwob et al, 1999). Néanmoins la restauration des projections vers le BO ne permet pas une ré-innervation identique. En effet, les axones nouvellement générés ciblent grossièrement la même partie du BO, mais viennent faire synapses dans plusieurs glomérules au lieu d'un ou deux comme avant la lésion (Schwob, 2005). Une même étude menée chez la souris avec une injection de méthimazole, qui induit une dégénérescence massive de l'EO mais préserve l'intégrité de la lame criblée et de la *lamina propria*, a permis de montrer une restauration complète de l'EO et des projections axonales vers le bulbe 45 jours après l'injection (Blanco-Hernandez et al, 2012).

Les cellules qui seraient à l'origine de cette régénération remarquable de l'ensemble des types cellulaires de l'EO seraient les cellules basales globulaires (CBGs) et / ou horizontales (CBHs) (Schwob et al, 1994 et 1995) que nous avons déjà décrit ci-dessus. Les CBGs seraient les progéniteurs des OSNs lors du renouvellement naturel et les CBHs seraient quant à elles les progéniteurs de l'ensemble des cellules de l'EO en cas de lésion / dommage (Ikeda et al, 2010).

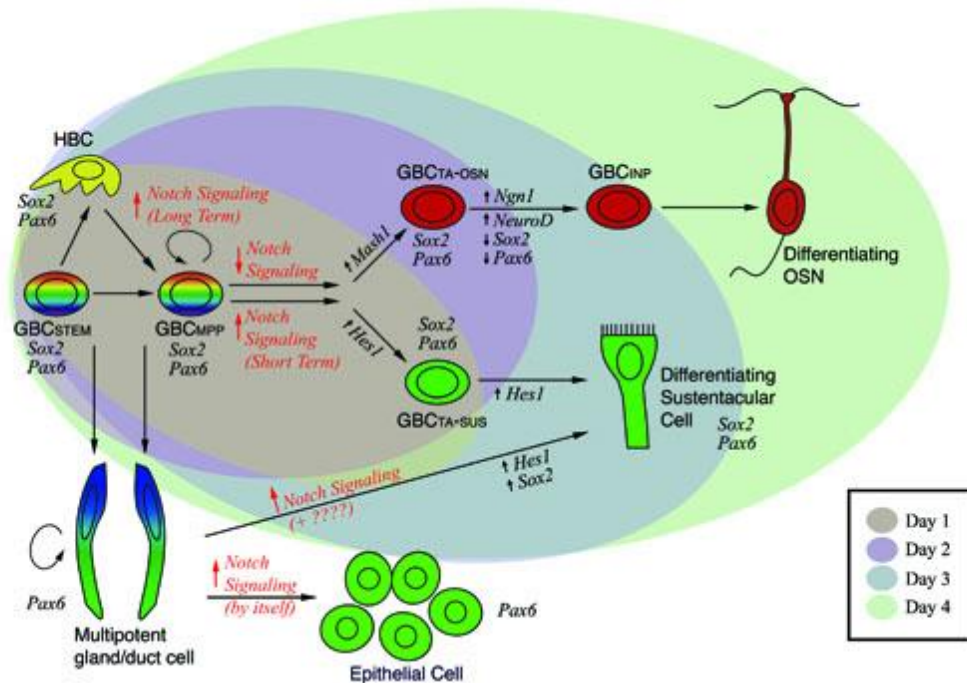
Dans la suite de ce paragraphe, nous détaillerons uniquement la régénération des NSOs dans le cas du renouvellement naturel.

La durée de vie des NSOs est considérablement courte. Il a été montré chez le rongeur que les NSOs avaient une durée de vie moyenne de 30 à 90 jours (Graziadei et Graziadei, 1979 ; Mackay-Sim et Kittel, 1991), bien que d'autres travaux aient montré que certains NSOs pouvaient perdurer plus d'un an (Hinds et al, 1984). Et cette durée de vie dépend de

l'activité du NSO. En effet, il a été montré chez la souris adulte qu'une stimulation odorante répétée des NSOs avec le ligand odorant du RO qu'ils expriment améliore leur survie, via l'expression de la protéine anti-apoptotique Bcl-2 (Watt et al, 2004).

Afin d'assurer le renouvellement des NSOs en fin vie, un système de régénération est donc mis en place. Ce système de régénération est actif dès la naissance et reste efficace jusqu'à la fin de vie de l'animal. Bien que deux études aient montré que les capacités de régénération ne sont pas affectées chez le rat âgé (Loo et al, 1996 ; Brann et Firestein, 2014), elles sembleraient néanmoins diminuées chez la souris âgée (Kondo et al, 2010).

Dans le cas précis du renouvellement des NSOs, ce sont les CBGs qui se divisent dans un premier temps en cellules progénitrices multipotentes (CPMs), exprimant le facteur de transcription Sox2, et sont à ce stade, capable de générer les multiples types cellulaires composants l'EO (Guo et al, 2010). Une fois que ces cellules progénitrices multipotentes se divisent en cellules progénitrices transitoires (CPTs), elles sont alors engagées dans un processus qui les conduit à se différencier en NSOs. Cette population exprime le facteur de transcription mammalian achaete-scute homolog 1 (Mash1) (Caggiano et al, 1994 ; Cau et al, 2002 ; Jang et al, 2003), essentiel au développement des NSOs (Guillemot et al, 1993). Ces cellules progénitrices Mash1+ donnent ensuite naissance à une autre population de cellules progénitrices transitoires, les précurseurs neuronaux intermédiaires (PNIs), qui expriment les facteurs de transcription neurogenin 1 (Ngn1) (Cau et al, 1997 et 2002) et Neuro D1 et NeuroD2 (Shaker et al, 2012). Ces deux populations de cellules progénitrices transitoires ont des capacités pour se renouveler automatiquement bien moins importantes que des cellules souche de base, mais une plus grande probabilité d'initier une différenciation terminale après différentes divisions cellulaires. Les cellules filles issus de la division de ces précurseurs intermédiaires se différencient ensuite en NSOs immatures avant d'aboutir à des NSOs matures (Nicolay et al, 2006 ; Treloar et al, 2010) (**Figure 10**).



**Figure 10** : Modèle de génération cellulaire de l'EO chez l'adulte – Régénération après un traitement au MeBr – après 1 jour zone grise – 2 jours zone mauve – 3 jours zone verte foncée et 4 jours zone verte claire GBC = globose basal cell / cellule basale globulaire – HBC = Horizontal Basal cell / cellule basale horizontale — OSN = olfactory sensory neuron / neurone sensoriel olfactif - adapté de [The James Schwob Lab](http://sackler.tufts.edu/Faculty-and-Research/Faculty-Research-Pages/James-Schwob) - <http://sackler.tufts.edu/Faculty-and-Research/Faculty-Research-Pages/James-Schwob>.

Dans ce premier chapitre, nous avons pu voir que, chez le rongeur, la mise en place de la MO se fait de façon très précoce au cours du développement embryonnaire et que la formation des glomérules commence en fin de gestation et va se poursuivre après la naissance.

Nous allons voir dans les chapitres suivants que le système olfactif est fonctionnel dès la fin de la gestation, que différentes études ont été menées afin de comprendre le rôle que peut avoir l'olfaction pendant cette période du développement pour le fœtus, et les conséquences phénotypiques que peuvent engendrer une exposition odorante pendant la période périnatale.



## Chapitre II : Détection, discrimination et préférence olfactive fœtale et odeurs dans le liquide amniotique et le lait.

Chez les mammifères, l'organisme en formation est plongé dans un environnement aquatique sous haute protection pendant toute la période de la gestation, puis au moment de la naissance, il est transféré brutalement dans un milieu aérien, dans des conditions nettement plus hostiles pour évoluer en autonomie progressive, selon les espèces. Un tel bouleversement implique pour le nouveau-né une adaptation rapide du point de vue physiologique et comportemental, afin de pouvoir répondre à ces nouvelles contraintes. Le nouveau-né va utiliser différentes clefs sensorielles (visuelles, olfactives, tactiles, auditives) afin d'accompagner les changements physiologiques qui vont lui permettre, entre autres, de respirer via les voies aériennes, de se mouvoir afin de se rapprocher du corps de sa mère, et également de localiser la ou les mamelles afin de pouvoir ingérer du colostrum, puis du lait. L'olfaction va jouer un rôle essentiel dans la mise en place et l'accompagnement de ces changements, tout particulièrement pendant la période périnatale, où l'animal voit peu et est peu mobile. Suite à cette adaptation soudaine après la naissance, le petit devra par la suite, sans cesse, continuer à adapter ses capacités olfactives afin de faire face à ses besoins alimentaires changeants, choisir sa nourriture en fonction de ses préférences, et également pour interagir avec ses congénères.

Comme nous allons le voir dans ce chapitre, l'environnement olfactif du petit pendant la période périnatale va influencer le développement de ses perceptions sensorielles et de ses préférences olfactives et alimentaires, et ce, dès la vie *in utero*, en participant à la reconnaissance et à l'attachement mère-enfant nécessaire à la survie du nouveau-né.

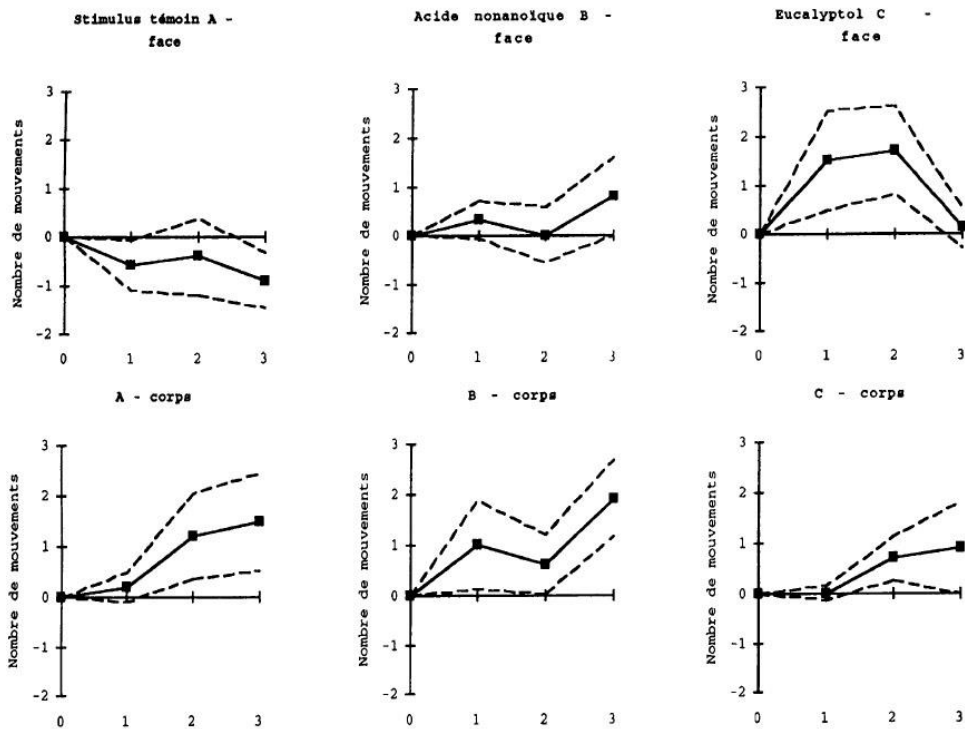
### **I. Développement précoce du système olfactif et fonctionnalité pendant la vie fœtale et les premiers jours de vie *ex utero***

Le système olfactif est structurellement constitué chez le fœtus à partir des derniers jours de gestation chez le rongeur et des dernières semaines chez l'humain. La meilleure façon de savoir si ce système est réellement fonctionnel, autrement dit si le fœtus est capable de détecter un odorant, reste d'observer les réponses comportementales du fœtus face à une stimulation odorante. Très peu d'études utilisant des tests de comportement olfactif ont été

menées sur le fœtus rongeur afin de mettre en évidence cette capacité olfactive prénatale. Il a néanmoins été montré chez le rat que des fœtus étaient capables de montrer une réponse motrice suite à une stimulation odorante. Ainsi, une augmentation de l'activité générale du fœtus a été mise en évidence suite à une infusion gazeuse intra-orale de citral ou de cyclohexanone par rapport à une infusion gazeuse avec l'odeur de la salle d'expérimentation (Smotherman et Robinson, 1990). Il a également été montré chez la souris que le fœtus montrait des réponses comportementales (mouvements des différentes parties du corps) nuancées après exposition à différentes solutions odorantes dans la cavité nasale le jour précédent la naissance (Coppola et Millar, 1997), mettant ainsi en évidence la capacité de détection, mais également de discrimination du fœtus dans les derniers jours de gestation. Chez l'humain, il paraît plus aisé de tester cette capacité de détection et de discrimination olfactive fœtale. En effet, nous pouvons considérer qu'effectuer des études chez le nourrisson prématuré dans la période suivant sa naissance reviendrait à tester des fœtus pris au même stade gestationnel, bien que dans le premier cas les odorants sont présents dans un milieu aérien alors que dans le second cas, ils sont présents dans un milieu liquide. Cependant, la comparaison des réponses comportementales suite à la présentation d'un stimulus odorant en phase liquide ou en phase gazeuse a été effectuée chez le fœtus de rat et les résultats obtenus ont montré une augmentation de l'activité générale identique pour les 2 types de stimuli (Smotherman et Robinson, 1990).

La capacité de détection olfactive a d'abord été mise en évidence au début du siècle par Stirnimann qui a observé chez un nourrisson prématuré né à 26 semaines de grossesse, l'apparition des mouvements buccaux en réponse à une exposition à une odeur anisée (Stirnimann, 1936). Puis d'autres études sont venues confirmer ces résultats chez des nourrissons prématurés nés entre 28 et 38 semaines de gestation (Goubet et al, 2002 ; Marlier et al, 2001 ; Sarnat, 1978).

En plus de la capacité de détection olfactive, des études ont mis en évidence la capacité de discrimination entre deux odorants chez ces nouveau-nés prématurés (Goubet et al, 2002 ; Marlier et al, 2001 ; Pihet et al, 1997) (**Figure 11**).



**Figure 11** : Graphiques montrant les variations de l'indice de réactivité comportementale (trait plein : moyenne, pointillés : erreur standard) du visage et du corps en réponse au stimulus témoin sans odeur (A), à une stimulation odorante à l'acide nonanoïque (B) ou à l'eucalyptol (C) chez le nourrisson prématuré de 31 à 37 semaines pour les 3 premières périodes poststimulation (0 = -5 à 0s (phase préstimulus), 1 = 0 à 5s, 2 = 6 à 10s, 3 = 11 à 15s - adapté de Pihet et al, 1997).

Il est à noter que la comparaison des réponses de nouveau-nés prématurés et nés à terme soumis aux mêmes stimulations odorantes ne met pas en évidence de différence notable dans les capacités de détection et de discrimination olfactive entre les 2 groupes (Goubet et al, 2002 ; Sarnat, 1978 ; Soussignan et al, 1997), renforçant l'idée que le système est fonctionnel bien avant le terme de naissance.

En conclusion de ce paragraphe, nous avons pu voir chez les mammifères que le système olfactif principal possède toutes les caractéristiques structurales et fonctionnelles dans le dernier stade gestationnel (quelques jours avant le terme chez le rongeur, 2 mois avant le terme chez l'humain). Le fœtus est donc capable de détecter avec sensibilité et discriminer des odorants de façon très précoce, *in utero*.

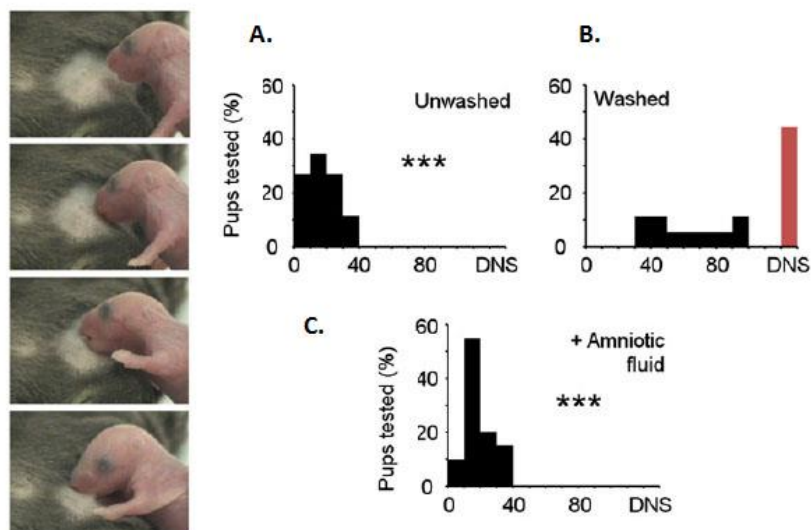
Nous allons maintenant voir qu'un système olfactif fonctionnel permet au nouveau-né de mémoriser une information olfactive liée aux deux liquides biologiques maternels vitaux que sont le liquide amniotique (LA) et le lait, ce qui va l'aider à survivre dans les premiers jours de vie et à développer par la suite des préférences pour certaines odeurs.

## II. Réponses comportementales du nouveau-né engendrées par l'odeur du liquide amniotique et du lait maternel

### A. Réponses comportementales du nouveau-né engendrées par les odeurs contenues dans le liquide amniotique

Le fœtus acquiert une connaissance de son environnement odorant dans le LA, car il est en contact avec ce LA et il en avale des quantités importantes pendant les derniers stades de gestation (Pritchard, 1965). Grâce aux mouvements de respiration fœtale, le liquide amniotique peut circuler dans les voies respiratoires supérieures à partir de 18-26 semaines de gestation chez l'humain, après résorption des bouchons épithéliales qui obstruaient jusqu'ici ces voies (Schaeffer, 1910). Le liquide amniotique, qui entre en contact direct avec les chimiorécepteurs présents au niveau des voies nasales, est donc continuellement renouvelé. Le fœtus va donc être exposé *in utero* à une variété d'odeurs de sources maternelles ou fœtales via le liquide amniotique dans lequel il baigne. Son système olfactif étant fonctionnel dans la dernière période gestationnelle, le fœtus est donc capable de percevoir ces odeurs, de les discriminer et comme nous allons le voir, de les mémoriser.

Chez le rongeur, les odeurs maternelles perçues *in utero*, via le LA, vont être essentielles à la survie du nouveau-né. En effet, à la naissance, le comportement maternel du rongeur est très stéréotypé : la mère retire d'abord la poche amniotique, puis lèche ses petits afin de les nettoyer et stimule leur respiration et enfin, elle se lèche le ventre, particulièrement au niveau de la zone englobant les mamelles (Rosenblatt et Lehrman, 1963). En se léchant, la mère imprègne son ventre avec sa salive et du liquide amniotique, laissant des clés olfactives qui vont instaurer le réflexe de tétée. Chez le rat, il a été montré que l'odeur du liquide amniotique promouvait l'attachement des nouveau-nés au mamelon (Teicher et Blass, 1977 ; Koffman et al, 1998). Le même type d'expérience effectuée sur des souriceaux, dans les heures suivant la naissance, montre qu'une mamelle préalablement lavée d'une souris allaitante anesthésiée n'induit pas de signes indiquant le début de la tétée. Et si l'on répète cette expérience en empreignant la mamelle de liquide amniotique après l'avoir lavée, les souriceaux retrouvent un comportement caractéristique amenant à la tétée (Al Aïn et al, 2013 ; Logan et al, 2012) (Figure 12).



**Figure 12** : Réponse de tétée innée chez le nouveau-né – Graphiques représentant le temps de latence pour saisir la mamelle et engendrer la tétée - A. la mamelle d’une mère allaitante non lavée, B. la mamelle d’une mère allaitante lavée et C. la mamelle d’une mère allaitante lavée puis imprégnée de liquide amniotique - Adapté de [Logan et al, 2012](#).

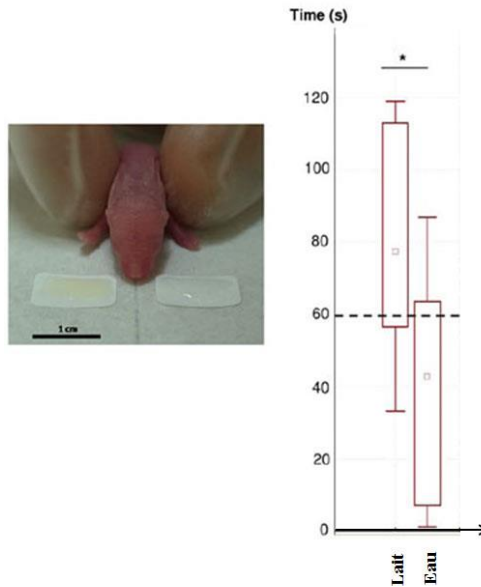
La mère, en effectuant ce comportement stéréotypé, va donc orienter le nouveau-né vers la mamelle, via des clés olfactives que ce dernier aura acquises *in utero*. Nous pouvons ainsi parler de continuité sensorielle guidée par les odeurs présentes dans le liquide amniotique. Ces odeurs reconnues et perçues comme attractives par le nouveau-né, vont l’aider à mettre en place un ensemble de comportements, notamment pour s’orienter vers la mamelle et s’alimenter. Le fœtus est donc capable de détecter, coder sélectivement et mémoriser l’information odorante disponible dans l’environnement dans lequel il baigne pendant la gestation. Le nouveau-né est, de plus, capable de discriminer l’odeur de son propre liquide amniotique de celle très proche d’un liquide amniotique non familier. Ce comportement a été observé chez différentes espèces mammifères : l’humain ([Schaal et al, 1998](#)), le rat ([Hepper, 1987](#)), le mouton ([Schaal et al, 1995a](#)) et le cochon ([Figuerola et al, 2013](#)), mettant ainsi en évidence la sensibilité du système et la notion de signature maternelle. En effet, Schaal et ses collaborateurs, en comparant les profils de chromatographie en phase gazeuse – spectrométrie de masse (GC-MS) d’échantillons de liquides amniotiques provenant de différentes mères, ont trouvé très peu de différences qualitatives de la composition chimique des différents échantillons, mais par contre des différences quantitatives ([Schaal et al, 1995b](#)). Pour une même espèce, le liquide amniotique de différents individus semble donc avoir une composition chimique très similaire. Grâce à la sensibilité de leur système olfactif et à la signature olfactive émise par chaque mère, le nouveau-né va néanmoins être capable de

discriminer son propre liquide amniotique de celui d'une autre mère. Une comparaison des profils odorants de liquides amniotiques prélevés chez deux lignées de souris différentes (C57BL/6J versus BALB/c) a également été effectuée par Logan et ses collaborateurs (Logan et al, 2012). Ces derniers n'ont observé aucune différence entre les liquides amniotiques des deux souches. Les compositions du liquide amniotique seraient donc également très similaires entre deux lignées de souris.

## **B. Réponses comportementales engendrées par l'odeur du lait maternel**

Comme nous l'avons vu dans le paragraphe précédent, chez le rongeur, le comportement stéréotypé de la mère à la naissance, qui imprègne son ventre et plus particulièrement ses télines de liquide amniotique après avoir léché ses petits, va orienter le nouveau-né vers la mamelle via les clés olfactives présentes dans le liquide amniotique. Cette continuité olfactive, mise en place par la mère, va faciliter la transition alimentaire de la matrice amniotique à une matrice lactée. Logan et ses collaborateurs ont ainsi montré chez des souriceaux retirés à leur mère à la naissance, après une césarienne, donc n'ayant eu aucun contact avec leur mère après la naissance, que si ce comportement stéréotypé de la mère n'est pas mis en place, le souriceau ne montrera pas d'attrance pour l'odeur du lait maternel (Logan et al, 2012). L'odeur du lait maternel et l'attrance pour cette odeur ferait donc partie d'un apprentissage postnatal.

Différentes études menées chez les mammifères montrent qu'après un ou plusieurs épisodes de tétées, le nouveau-né est ensuite capable de détecter et de manifester une attrance pour l'odeur du colostrum et du lait. Ce comportement a été mis en évidence par un test d'orientation de la tête à 2 choix, chez l'humain sur des nouveau-nés de quelques jours, nourris au sein, suite à une stimulation avec du colostrum ou du lait maternel non familier (Marlier et Schaal, 1997 ; Marlier et al, 1998a), chez la souris sur des souriceaux de 2 à 6 jours (Al Aïn et al, 2012) (Figure 13) et chez le porc sur des porcelets juste après la naissance (Parfet et Gonyou, 1991).



**Figure 13** : Attirance du nouveau-né de 2 jours pour l’odeur du lait maternel – à gauche : photo du dispositif comportemental mis en place pour tester le souriceau à PN2 – à droite : Graphique en boxplot - temps passé la tête orientée vers les 2 sources lait ou eau contrôle - adapté de [Al Aïn et al, 2012](#).

D’autres études menées chez l’humain sont venues appuyer cette idée. Des changements du rythme respiratoire ont été observés chez le nouveau-né nourri au sein ou au biberon après stimulation avec l’odeur d’un lait maternel non familial dans les jours suivant la naissance ([Soussignan et al, 1997](#)). Et des nourrissons de quelques jours, nourris au sein, vont effectuer davantage de mouvements de succion au niveau de la bouche lorsque l’odeur du lait de leur mère leur est présentée par rapport à un support non imprégné ([Doucet et al, 2007](#) ; [Mizuno et al, 2004](#)). Il en est de même chez le lapereau de quelques jours après la naissance avec la présentation d’une pipette de verre remplie de lait maternel ([Keil et al, 1990](#)).

L’odeur du colostrum et du lait maternel déclenche donc une réponse sensorielle ou motrice caractéristique chez le nouveau-né quelques jours après la naissance, qui montre leur réelle attirance pour ces odeurs.

Tout comme avec le liquide amniotique, le nouveau-né est capable de discriminer l’odeur du lait d’une autre mère de celui de sa propre mère et manifester une préférence pour ce dernier, chez l’humain ([Marlier et Schaal, 1997](#)). De plus, des souriceaux de 2, 6 et 12 jours sont capables de discriminer du lait prélevé au même stade de lactation par rapport à du lait maternel prélevé à un stade de lactation différent du leur ([Al Aïn et al, 2012](#)). De même, des souriceaux de 2 jours montrent une préférence pour un lait prélevé à son stade de lactation

et d'une mère de la même lignée (Al Aïn et al, 2015). Ce mécanisme conservatif de préférence évolue donc au cours du temps et accompagne l'expérience de l'individu : alors qu'à 2 jours, le nouveau-né nourri au sein montre une préférence pour l'odeur du liquide amniotique par rapport à l'odeur du colostrum, il préfère l'odeur du lait maternel par rapport à l'odeur du liquide amniotique à 4 jours (Marlier et al, 1998a).

Tout ceci traduit donc un phénomène de plasticité sensorielle postnatale important. Les premiers jours suivants la naissance, le nouveau-né est davantage attiré par l'odeur du liquide amniotique dans laquelle il a baigné *in utero* pendant tout le temps de la gestation plutôt que par des odeurs qu'il a rencontré au cours de ses premiers jours de vie *ex utero*. L'apprentissage olfactif pendant la vie fœtale aurait donc un effet plus important sur les préférences olfactives du nouveau-né pendant ses premiers jours de vie que l'apprentissage olfactif postnatal.

En conclusion de ce paragraphe, chez le rongeur, la continuité sensorielle établie par la mère est primordiale car chez ces espèces, l'orientation vers la mamelle et l'initiation de la tétée, essentielles pour la survie, sont principalement médiées par des clés olfactives mémorisées *in utero*. Tout comme l'odeur du liquide amniotique, l'odeur du lait maternel va également déclencher chez le nouveau-né un ensemble de comportements caractéristiques qui vont induire la tétée, bien que ces odeurs nécessitent un apprentissage postnatal avant de pouvoir déclencher un comportement du nouveau-né. Ce phénomène a été observé dans les instants suivant la naissance, chez des souriceaux avant leur première épisode de lactation mais ayant été en contact avec leur mère (Al Aïn et al, 2013). Chez le rongeur, le nouveau-né est donc capable de s'orienter vers la mamelle et d'initier la tétée via les clés olfactives présentes dans le lait maternel, bien qu'il n'ait encore jamais eu d'expérience avec ce fluide. Ce dernier argument prouve bien que les clés olfactives présentes dans le lait sont identiques à celles mémorisées *in utero* via le liquide amniotique. Dans ce sens, il a été montré qu'il y aurait une grande ressemblance au niveau des propriétés chimiosensorielles entre le liquide amniotique, le colostrum et le lait maternel (Etievant et al, extrait du livre Flavor, 2016).

### **C. Discontinuité sensorielle entre environnement *in* et *ex utero*.**

La notion de continuité sensorielle, mise en place par la mère, semble donc indispensable pour la mise en place de la tétée chez le rongeur. Cependant, une étude antérieure à celle de Logan et ses collaborateurs nuancent les résultats mis en évidence par ces



derniers. Dans cette étude, des rats nés par césarienne, donc n'ayant eu aucun contact avec la mère après la naissance et n'ayant effectué aucun épisode de tétée, initient la tétée sur une mamelle artificielle imprégnée avec du lait maternel (Koffman et al, 1998). Malgré la discontinuité sensorielle, les rats ont néanmoins été capables d'initier la tétée en se basant sur les clés olfactives présentes dans le lait maternel bien qu'ils n'aient encore eu aucun contact avec ce fluide.

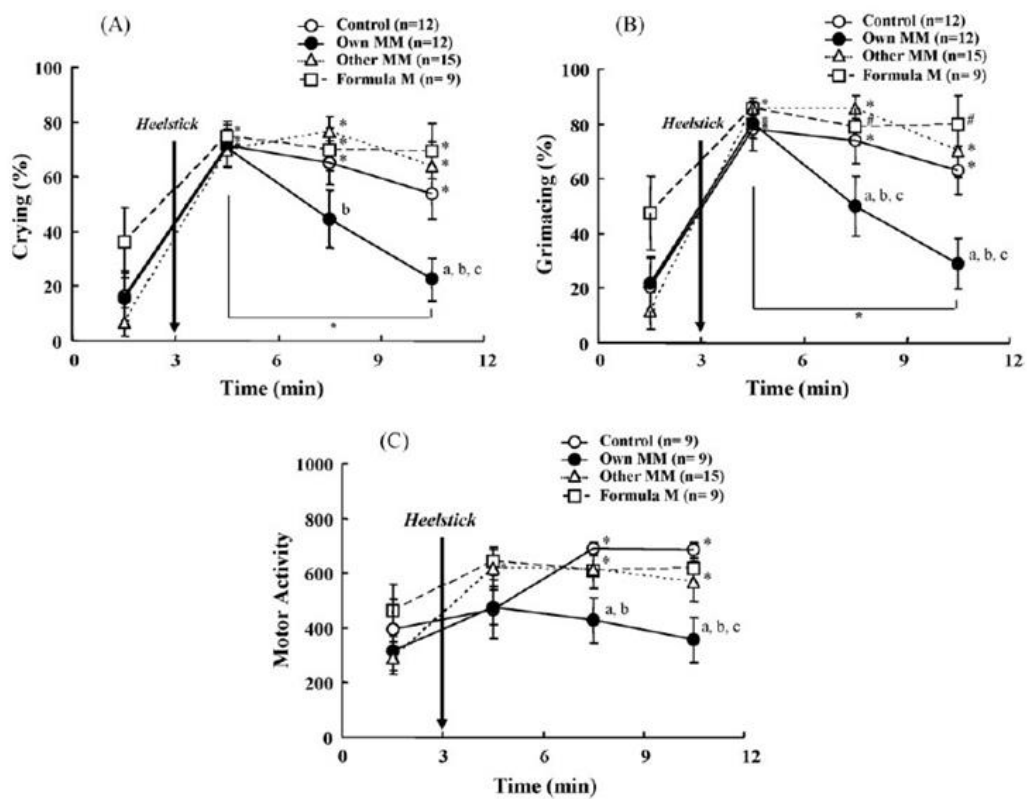
Chez l'humain, d'autres mécanismes entrent en jeu pour la mise en place de la tétée. Le comportement de préférence olfactive pour du lait maternel a également été mis en évidence chez des nouveau-nés nourris au biberon, pour qui cette odeur ne devrait pas faire sens, ne faisant pas partie de leur environnement olfactif depuis la naissance. Ainsi, des nouveau-nés prématurés de 10 – 14 jours, nourris depuis leur naissance par sonde gastrique puis au biberon, voit leur fréquence et leur pression de tétée augmenter en présence de l'odeur de lait maternel par rapport à l'odeur du lait maternisé familial ou d'un contrôle (eau distillée) (Mizuno et Ueda, 2004). Et des nouveau-nés de 4 jours, nourris au biberon, montrent une préférence pour l'odeur du liquide amniotique par rapport à l'odeur du lait maternisé qui leur est familier (Marlier et al, 1998b ; Marlier et Schaal, 2005). Ces résultats perceptuels et comportementaux montrent à nouveau la sensibilité du système olfactif du nouveau-né capable dès la naissance de discriminer deux odeurs, mais également que le fœtus est capable de conserver l'information sensorielle olfactive de son environnement *in utero* même si la continuité sensorielle entre l'environnement olfactif *in* et *ex utero* a été interrompue.

#### **D. Autres effets comportementaux liés aux odeurs maternelles**

Des études ont montré que les odeurs présentes dans le liquide amniotique et le lait maternel pouvaient avoir d'autres effets sur le comportement du nouveau-né. Dans une première étude, Varendi et ses collaborateurs ont montré une diminution des pleurs chez des nouveau-nés, nés à terme, séparés de leur mère en présence de l'odeur du liquide amniotique par rapport à des nouveau-nés séparés de leur mère sans odeur additionnelle (Varendi et al, 1998). Ce même effet a également été montré chez des nouveau-nés prématurés et nés à terme pendant un prélèvement sanguin au niveau du talon en présence de l'odeur du lait de leur mère (Badiee et al, 2013 ; Nishitani et al, 2009) (Figure 14), et chez des nouveau-nés nés à terme qui étaient en train de pleurer, suite à la présentation de l'odeur de leur mère (Sullivan et Toubas, 1998). Il a également été observé qu'il n'y avait pas d'augmentation du taux de

cortisol salivaire, indicateur majeur de l'état de stress, chez les petits soumis au prélèvement sanguin en présence de l'odeur du lait de leur mère, contrairement à des petits soumis au même prélèvement en présence de l'odeur de lait maternisé (Badiee et al, 2013).

L'odeur du liquide amniotique et du lait maternel auraient donc des effets apaisants chez le nouveau-né lorsqu'il est soumis à un stress, se traduisant par des effets comportementaux (diminution des pleurs) et biochimiques (diminution du taux de cortisol salivaire) associés, conduisant à modulation de l'état de stress du nouveau-né.



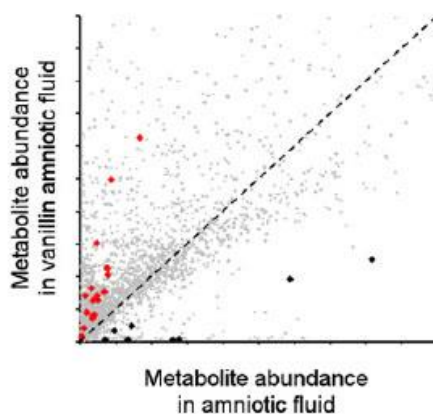
**Figure 14** : Diminution des comportements de réponse à la douleur du nouveau-né soumis à un prélèvement sanguin au niveau du talon en présence de l'odeur de lait maternel – **A.** durée moyenne des pleurs, **B.** Durée moyenne d'expression faciale de grimace, **C.** Durée moyenne d'activité moteur – control : prélèvement effectué en présence d'odeur – Own MM : prélèvement effectué en présence de l'odeur du lait de la propre mère du petit testé – Other MM : prélèvement effectué en présence de l'odeur du lait d'une autre mère – Formula M : prélèvement effectué en présence de l'odeur de lait maternisé – adapté de Nishitani et al, 2009.

### III. Effet de l'alimentation de la mère sur l'odeur du liquide amniotique et du lait

La plupart des composants odorants retrouvés dans le liquide amniotique proviennent de l'alimentation de la mère ou des métabolites des aliments ingérés (Etievant et al, livre Flavor, 2016). En fonction de la composition odorante de son alimentation, la mère va donc apporter son empreinte personnelle à la composition odorante de son liquide amniotique et va ainsi influencer les préférences olfactives de ses petits. Les solutés présents dans le sang de la mère sont sous influence des arômes de l'alimentation maternelle, et influencent à la fois le liquide amniotique et le lait, ce qui conduit à une signature aromatique similaire.

Si peu d'études ont été menées pour mettre en évidence le passage de composés odorants de l'alimentation ou de la boisson de la mère vers le liquide amniotique, néanmoins il en existe davantage pour le lait, en particulier chez l'homme.

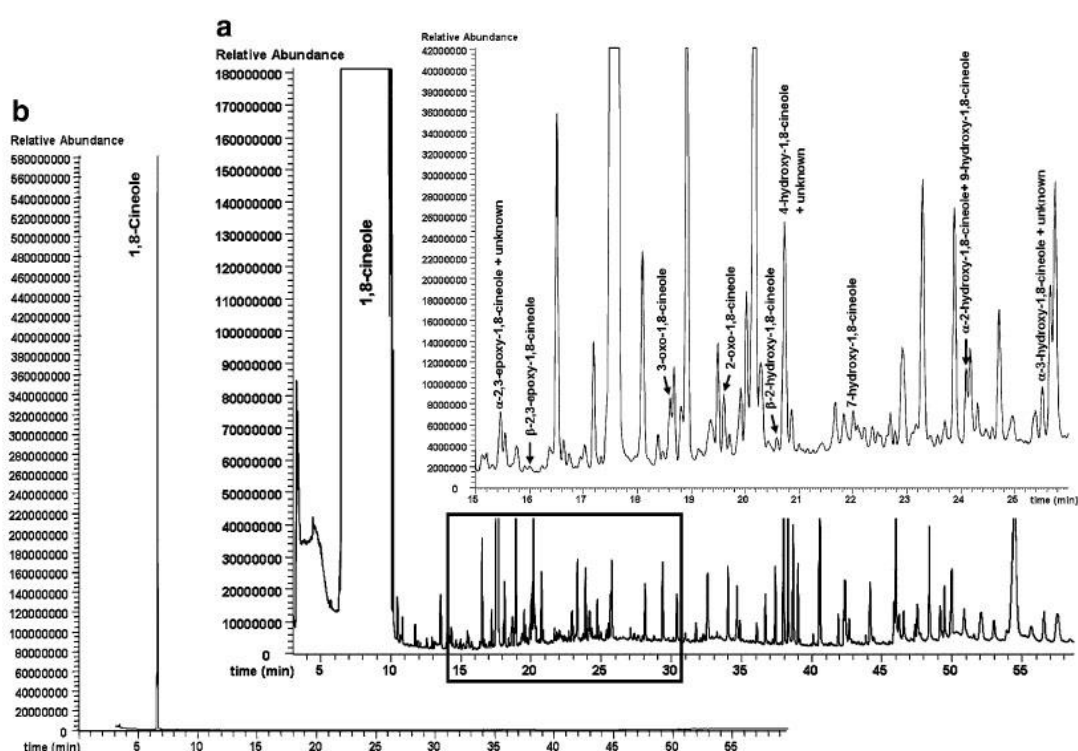
D'abord, un panel de juges entraînés a détecté la présence d'une odeur caractéristique de curry et cumin dans le liquide amniotique de femmes ayant consommé de la nourriture épicée (Hauser et al, 1985), et la présence de l'odeur d'ail dans des échantillons de liquide amniotique prélevés chez des femmes ayant ingéré une capsule d'huile essentielle d'ail 45 minutes avant les prélèvements (Mennella et al, 1995) ou dans des échantillons de liquide amniotique prélevés chez des brebis gavées avec de l'huile essentielle d'ail 100 minutes avant les prélèvements (Nolte et al, 1992). Dans cette même étude, la présence de l'odeur d'ail n'a pas été retrouvée dans des prélèvements effectués 50 et 150 minutes après le gavage, mettant ainsi en évidence une évolution dans la cinétique d'odorisation du liquide amniotique. Enfin, une étude menée chez la souris par GC-MS a comparé les compositions moléculaires de liquide amniotique de souris ayant consommé des boissons aromatisées ou non avec de l'ail ou de la vanilline. Il a ainsi été montré que les liquides amniotiques prélevés à partir de mères odorisées voyaient leur profil odorant varier seulement de 2,2 % par rapport à du liquide amniotique prélevé chez une mère non odorisée (Logan et al, 2012) (Figure 15).



**Figure 15** : Analyse de la composition en métabolites de liquides amniotiques contrôles (noir) et de liquides amniotiques issus de mère ayant consommé de la vanilline (rouge) – 29 métabolites (points rouges / noirs) parmi les 3091 ont montré des différences significatives au niveau de leur abondance - adapté de [Logan et al, 2012](#).

Pour ce qui est des études menées sur le lait maternel, l'odeur d'ail dans du lait prélevé chez des femmes 2h après ingestion d'une capsule d'huile essentielle d'ail, l'odeur d'alcool dans du lait prélevé chez des femmes 1h après ingestion d'une boisson alcoolisée et l'odeur de carottes dans du lait prélevé chez des femmes 2h après ingestion de jus de carottes ([Mennella et Beauchamp, 1991a ; 1991b et 1999](#)) ont été mises en évidence par un panel de juges entraînés. Ces premiers résultats montrent qu'il y a bien un transfert des composés volatils contenus dans l'alimentation ou la boisson de la mère dans le lait et que tous les composés ne sont pas transférés à la même vitesse, mettant ainsi en évidence une sélectivité dans la cinétique de transfert. Puis une analyse GC-MS plus fine d'échantillons de laits prélevés chez des brebis ayant consommé des graines de cumin a permis de révéler la présence de 4 des 6 composés volatils les plus représentés dans l'arôme de cumin ([Désage et al, 1996](#)), mettant ainsi en évidence le fait que les différents composés volatils présents dans l'alimentation de la mère vont être métabolisés lors de la digestion et que seulement certains des métabolites obtenus vont être excrétés dans le lait maternel, ce qui a été confirmé sur des laits collectés à différents temps chez des femmes après ingestion d'une capsule contenant différents arômes (d-carvone, l-menthol, 3-methylbutyl acetate and trans-anethole). Seuls 3 des 4 arômes ingérés ont été retrouvés dans le lait, et ce en faible quantité malgré la forte quantité ingérée et à des temps différents ([Hausner et al, 2008](#)). 2 études menées sur le transfert de l'1-8-cinéole (eucalyptol), ont mis en évidence l'oxydation des composés présents dans cette molécule avant son excrétion dans le lait. En effet, 10 métabolites différents issus de l'oxydation de l'1-

8-cinéole ont été retrouvés dans le lait à des temps différents et avec une grande diversité inter et intra individuelle (Kirsh et al, 2012 et 2013) (Figure 16). Enfin, une étude très récente est venue confirmer ces notions de métabolisation avant transfert, de vitesse de transfert et de différence intra- et inter- individuelle dans le temps d'excrétion. Ainsi, Scheffler, en couplant la technique de GC-MS à l'olfactométrie (GC-MS/O) a pu identifier 3 métabolites présents dans le lait maternel après ingestion d'ail, dont 1 seul a été jugé comme ayant une odeur. De plus, il a montré que le niveau d'expression des métabolites dans le lait était dépendant du temps et il a retrouvé de fortes variations inter individuelles (Scheffler et al, 2016).



**Figure 16 :** Chromatogramme obtenu après une analyse GC-MS de 1,8-Cineole (eucalyptol)  
a) solution pure injectée dans la colonne et b) solution au 1/10 000<sup>e</sup> injectée dans la colonne – le premier pic correspond à l'1,8-cineole et les pics suivants à ses différents métabolites – adapté de Kirsh et al, 2013.

En conclusion de ce chapitre, nous avons pu voir qu'à partir du dernier stade gestationnel, le fœtus est doté d'un système olfactif fonctionnel lui permettant de détecter, discriminer et mémoriser les odorants présents dans son environnement olfactif. Chez le rongeur, l'apprentissage de cet environnement olfactif *in utero* est primordial pour la survie du nouveau-né dans les premiers jours de vie et lui permet de développer par la suite des préférences pour certaines odeurs connues. L'alimentation de la mère représente une source importante de composés odorants qui, après ingestion, sont métabolisés puis peuvent être transférés dans le liquide amniotique et enrichir l'environnement olfactif du fœtus *in utero*. Ces composés odorants ou leurs métabolites issus de l'alimentation sont par la suite transférés via le lait au nouveau-né pendant la période de lactation.

## **Chapitre III : Environnement olfactif périnatal et influence sur les préférences olfactives et alimentaires, la structuration du système olfactif et la modulation du stress**

Comme nous l'avons vu dans le chapitre précédent, au cours de la gestation, le fœtus mammifère, dont le SO est fonctionnel avant la naissance, est exposé *in utero* à une diversité importante d'odeurs via le liquide amniotique dans lequel il baigne. Les différents composés odorants présents sont d'origine maternelle et fœtale, et proviennent de la métabolisation des aliments ingérés par la mère ainsi que de la régurgitation du fœtus.

Les jours suivants la naissance, ces clés olfactives apprises *in utero* vont être essentielles à sa survie puisqu'elles vont lui permettre de s'alimenter. Puis, l'allaitement prolonge ce transfert d'odorants entre la mère et le petit et favorise le maintien du lien maternel. De plus, ces odeurs apparaissant également comme apaisantes pour le petit.

Dans ce chapitre, nous passerons donc en revue les travaux majeurs qui ont été publiés montrant que la manipulation de l'environnement odorant périnatal est susceptible d'influencer la descendance en modulant le comportement olfactif et alimentaire, la structuration du système olfactif et le stress.

### **I. Odorisation prénatale, postnatale et périnatale : influence sur le comportement médié par l'olfaction et les odeurs alimentaires et sur le comportement alimentaire**

Nous nous focaliserons sur les travaux ayant utilisé des protocoles d'exposition odorante sans conditionnement aversif, de nombreux autres travaux visant aussi les effets de l'odorisation post-natale avec ce type conditionnement. Nous ne citerons pas non plus les nombreux travaux traitant de l'alcoolisation *in utero*.

#### **A. Influence sur le comportement médié par l'olfaction et les odeurs alimentaires**

Plusieurs travaux démontrent qu'il est possible d'odoriser artificiellement le fœtus et/ou le nouveau-né pour induire des effets comportementaux dès la naissance. Des effets sont décrits

avec plusieurs odeurs complexes ou odorants simples, administrés en une seule fois ou en chronique et impactent généralement le comportement olfactif des animaux dès leur naissance. Selon l'âge des animaux, il est généralement étudié par une mesure de préférence au jeune âge (temps passé sur la source odorisée ou pas, qu'elle soit la mamelle ou un support inerte ; réflexes de tétée), ou plus tard (préférence de place, choix de consommation).

### **1) Influence sur le comportement médié par l'olfaction à la naissance (PN0 à PN3)**

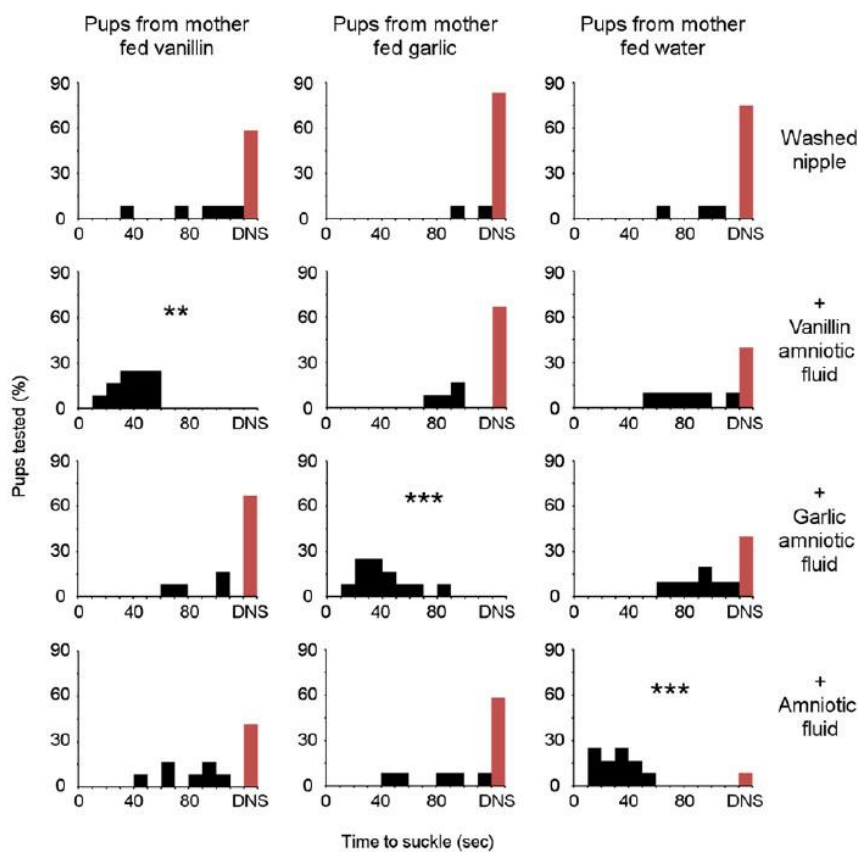
Tout d'abord, les travaux pionniers dans ce domaine ont montré que l'environnement olfactif oriente et stimule les ratons au moment de l'attachement à la mamelle lors de la première tétée. Ainsi, l'injection directe *in utero* de citral dans le liquide amniotique de rates gestantes aux 2 derniers jours de gestation, suivie d'une exposition des ratons dans une atmosphère odorisée au citral dès la naissance après césarienne, entraîne le déclenchement de la tétée uniquement sur la mamelle imprégnée de citral (Pederson et Blass, 1982). Néanmoins, il semblerait que cet effet soit déclenché par le cumul pré et post-natal, car il n'a pas été retrouvé chez des ratons odorisés en pré ou en post-natal seulement.

Les études ultérieures menées chez d'autres d'espèces de Mammifères confirment une modification des préférences olfactives des animaux suite à une exposition odorante prénatale via l'alimentation de la mère, généralement réalisée en fin de gestation et concluent à une augmentation de l'intérêt de l'animal pour l'odeur apprise. Chez l'humain d'abord, Schaal et ses collaborateurs ont montré une préférence du nouveau-né exposé *in utero* à l'odeur d'anis pour cette odeur par rapport à une odeur contrôle (Schaal et al, 2000). Chez le lapin, l'ajout de baie de genévrier dans l'alimentation de la mère en fin de gestation développerait chez le lapereau une préférence pour l'odeur de ces baies les jours suivants la naissance (Hudson et Distel, 1998 ; Semke et al, 1995), de même avec l'odeur du cumin chez le lapereau le jour de sa naissance (Coureaud et al, 2001), l'odeur de citral chez l'agneau 1h après naissance (Schaal et al, 1995a), l'odeur de fromage (Becques et al, 2009) et l'odeur de vanilline et de 4-ethylguaiacol (odeur fumée) (Hepper et al, 2012) chez le chaton de 2 jours et l'odeur d'anis chez le chiot d'1 jour (Hepper et Wells, 2006). De plus, il semblerait que l'exposition prénatale puisse également agir sur l'acceptabilité de l'odeur, en limitant chez les individus odorisés l'aversion que peuvent avoir des individus non familiers à cette odeur, comme montré chez l'humain pour l'anis ou l'ail (Hepper, 1995 ; Schaal et al, 2000).



Enfin, Logan et ses collaborateurs ont montré que la consommation par la mère, pendant la fin de gestation, d'une boisson odorisée modifie le contenu olfactif du liquide amniotique et ainsi le comportement des souriceaux pour initier la tétée à PNO sur un test de choix (Logan et al, 2012). Dans cette étude, les souriceaux n'initient la tétée sur une mamelle préalablement lavée uniquement si elle a été imprégnée avec du liquide amniotique provenant d'une mère ayant consommé une boisson odorisée de la même manière que sa mère biologique pendant la fin de gestation. Et cette attirance pour l'odeur apprise in utero est observée pour différentes odeurs complexes (ail, vanille) (Figure 17).

L'ajout d'un composé odorant dans le liquide amniotique, via la boisson de la mère pendant la fin de gestation, va donc générer une réponse différentielle des souriceaux PNO pour initier la tétée, en fonction de l'odorant ajouté *in utero*. La présence de l'odorant additionnel renforce la préférence du souriceau et induit une discrimination positive entre mamelles odorisées et non odorisées.

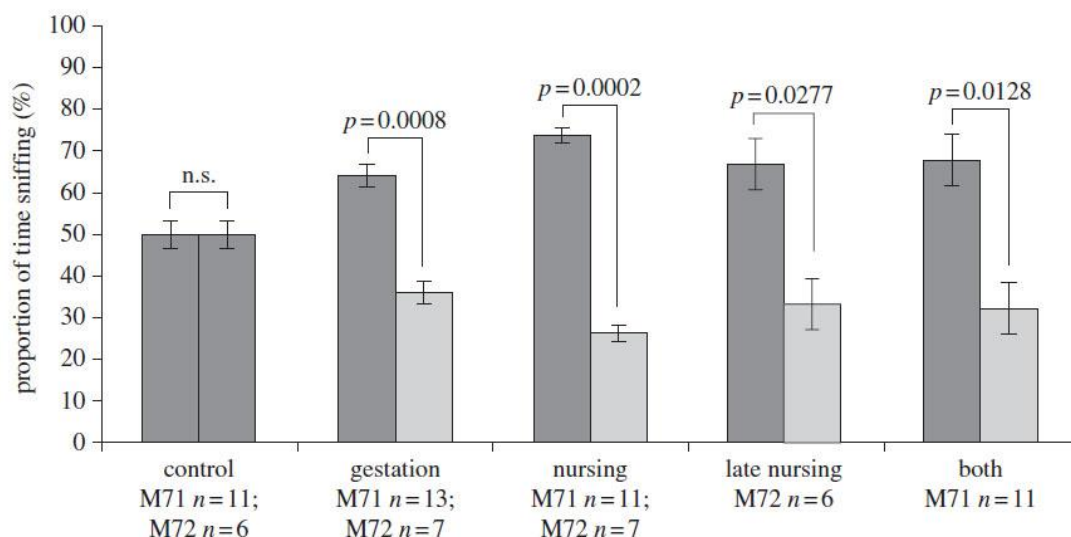


**Figure 17** : Effet de l'odorisation prénatale via la boisson de la mère sur l'initiation de la tétée chez le souriceau – Premier épisode de tétée déclenché grâce à la signature olfactive maternelle - Graphiques représentant le nombre de souriceaux ayant tété en fonction du temps – Les souriceaux n'initient la tétée qu'en réponse à la signature olfactive du liquide amniotique rencontré pendant la gestation - adapté de Logan et al, 2012.

Quelle que soit l'espèce, quel que soit le composé odorant et quel que soit le mode d'odorisation, une exposition odorante majoritairement prénatale va donc induire une préférence pour ce même odorant chez les animaux à la naissance. Cependant, la plupart de ces études « mixent » inévitablement des effets pré- et post-nataux, car très peu arrêtent l'exposition odorante maternelle à la naissance, en utilisant des césariennes ou des adoptions pour limiter le renforcement positif lié à l'interaction sociale et nutritionnelle avec la mère biologique à la première tétée.

## 2) Influence sur le comportement médié par l'olfaction avant le sevrage

Plusieurs études ont montré des effets à plus long terme d'une exposition odorante périnatale et décortiqué l'influence respective de la période pré- et post-natale dans l'établissement des préférences médiées par les odeurs. Comme pour les études à court terme, la plupart de ces travaux montrent un effet positif, comme chez le raton de 12 jours suite à une exposition odorante prénatale via l'alimentation de la mère en fin de gestation à l'ail (Hepper, 1988), prouvant que cet effet perdure même plusieurs jours après l'arrêt de l'exposition odorante. Todrank et ses collaborateurs ont étudié l'effet de la fenêtre temporelle d'exposition: gestation, lactation, ou les 2 périodes cumulées sur le temps d'exploration pour différentes sources odorisées ou non. Ainsi, des souriceaux de 20 jours, pré-exposés à un odorant en pré, post ou périnatale via l'alimentation de la mère (concentration 1% v/w) montrent une préférence pour cet odorant, et ce spécifiquement avec deux odorants différentes (cerise et menthe) sur deux lignées de souris transgéniques différentes (Todrank et al, 2011) (Figure 18). Une exposition odorante pendant ces 2 périodes cruciales dans le développement de l'animal, indépendamment ou cumulées, induit donc une modification des préférences olfactives des animaux à l'âge du sevrage. Malgré l'arrêt de l'exposition à la naissance (groupe gestation), cette étude montre que l'effet perdure plusieurs jours après la naissance. C'est également la première étude citée qui montre que les effets comportementaux sont similaires que l'exposition odorante soit uniquement en post-natal (groupe nursing) ou sur les 2 périodes cumulées (groupe both).

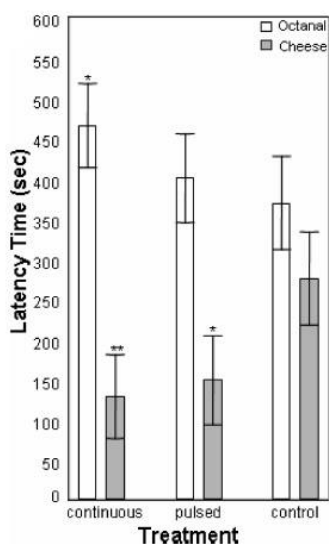


**Figure 18** : Une exposition odorante pendant différentes fenêtres temporelles de la gestation et de la lactation engendre des préférences olfactives au sevrage - Graphique montrant le temps moyen passé à explorer la croquette odorisée à la cerise ou à la menthe pour les différents groupes expérimentaux – control : souriceaux non exposés – gestation : souriceaux exposés pendant la fin de gestation – nursing : souriceaux exposés pendant la période de lactation – late nursing : souriceaux exposés à la fin de la période de lactation – both : souriceaux exposés pendant la période de fin de gestation et de lactation - Les souriceaux n’ayant pas été exposés ne montrent de préférence pour aucune des 2 sources (barres gris clair) – Les souriceaux ayant été exposés pendant la gestation, la lactation ou les 2 périodes montrent une préférence pour l’odeur consommée par leur mère (cerise pour M71, menthe pour M72) par rapport à une nouvelle odeur (barres gris foncé) - adapté de [Todrank et al, 2011](#).

Cependant, certains travaux indiquent des effets plutôt négatifs de l’odorisation sur les préférences médiées par l’olfaction, mais ont été conduites sur des fenêtres postnatales. Kerr et Belluscio ont montré chez le souriceau un renforcement du comportement aversif mesurées par un test de préférence de place suite à des expositions répétées à un odorant pendant la lactation. Ainsi, des souriceaux de 11 jours exposés à de l’octanal (concentration 1% v/v) appliqué quotidiennement sur les mamelles de leur mère vont passer moins de temps dans un compartiment odorisé avec cet odorant que dans un compartiment contrôle non odorisé, alors que des souriceaux non exposés passent autant de temps dans les deux compartiments ([Kerr et Belluscio, 2006](#)). Alors qu’une exposition avec un composé aversif, pendant la période prénatale induirait une levée de l’aversion chez les animaux après la naissance ([Hepper, 1995](#) ; [Schaal et al, 2000](#)), une exposition post-natale répétée avec un composé odorant aversif semble, quant à elle, renforcer l’évitement pour ce composé odorant.

Dans des conditions analogues, Barbour et ses collaborateurs ont montré une désensibilisation périphérique à l’octanal chez des souriceaux exposés en continu à l’octanal (concentration

0,01% v/v) via l'environnement entre PN10 et PN31 sur un test de cookie caché. En effet, ces souriceaux voient leur temps de latence pour trouver un tube contenant de l'octanal augmenter par rapport à des animaux contrôle non exposés. Mais cette habitude n'a pas été retrouvée chez des souriceaux exposés par petite séquence plusieurs fois par jour (Barbour et al, 2008) (Figure 19). Les auteurs ont confirmé cette désensibilisation périphérique en effectuant des électroolfactogrammes (EOG) sur la MO des souriceaux (développé ci-dessous).



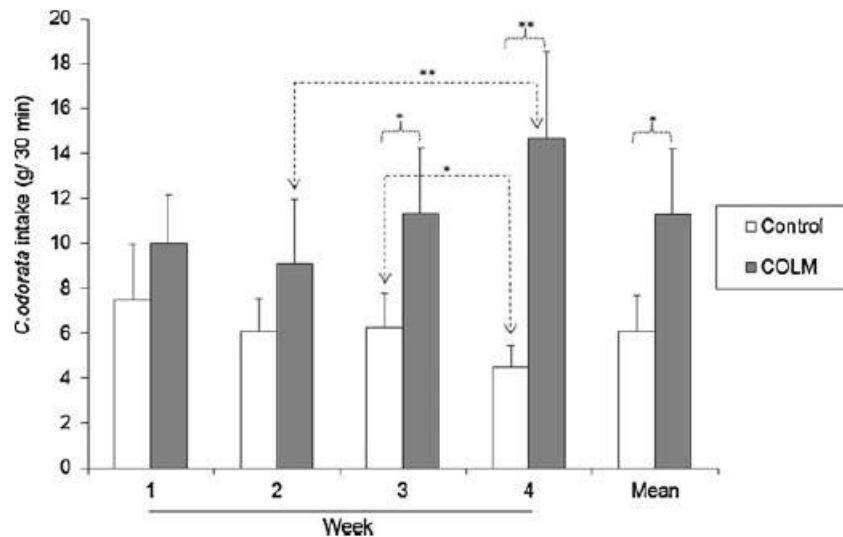
**Figure 19** : Temps de latence pour trouver un tube contenant soit une odeur de fromage (barres grises) soit de l'octanal (barres blanches) pour 3 groupes de souriceaux : « continuous » = souriceaux exposés à l'octanal en continu via l'environnement entre PN10-31, « pulsed » = souriceaux exposés à l'octanal en pulse (4 x 15 min / jour) via l'environnement entre PN10-31 et « control » = souriceaux non exposés à l'octanal– adapté de Barbour et al, 2008.

Les jours suivant la naissance, les préférences olfactives sont donc influencées par l'environnement olfactif rencontré pendant la gestation. Cette plasticité importante médiée par la signature olfactive maternelle facilite le passage du nouveau-né d'une alimentation via le liquide amniotique *in utero* au lait maternel *ex utero*. Cette plasticité reste importante dans la période postnatale et va engendrer des réponses différentielles en fonction de la valence hédonique ou affective de l'odorant utilisé lors de l'exposition. La valence hédonique d'un odorant, autrement dit l'effet plaisant ou déplaisant que l'individu va associer à cet odorant, est en effet fortement influencée par les propriétés physicochimiques de l'odorant (Mandairon et al, 2009a), la concentration de l'odorant, mais aussi par l'expérience et l'apprentissage (Barkat et al, 2008).

## **B. Influence sur le comportement alimentaire**

Nous venons de voir les effets d'une exposition odorante périnatale sur le comportement postnatal médié par l'olfaction, jusqu'au sevrage. Nous allons maintenant voir que les effets peuvent être observés à long terme en modifiant aussi le comportement médié par les odeurs alimentaires du jeune au sevrage et à l'âge adulte.

Dans une étude ancienne, il a été montré qu'une injection de jus de pomme dans le liquide amniotique de fœtus de rats en fin de gestation entraîne une augmentation de la consommation en jus de pomme des rats pré-exposés testés à l'âge de 60 jours (Smotherman, 1982a). Chez la souris, une exposition pendant la gestation à l'OAP (Ortho-AminoacétoPhénone) via la boisson de la mère entraîne une augmentation de la consommation en boisson supplémentée avec ce même odorant chez le souriceau au sevrage puis à l'âge adulte, traduisant une préférence pour la boisson odorisée (Nolte et Mason, 1994). De plus, l'OAP étant connu comme un composé aversif pour la souris, une exposition prénatale avec ce composé odorant a permis de lever cette aversion. Chez d'autres espèces, des tests de choix de nourriture après exposition *in utero* à un odorant via l'alimentation de la mère ont montré que les individus développent une préférence alimentaire pour la nourriture odorisée avec le composé odorant avec lequel ils ont été familiarisés *in utero*. Cela a été montré chez l'enfant de 8-9 ans avec l'ajout d'ail dans le régime alimentaire de la mère en fin de gestation (Hepper et al, 2013) et chez l'enfant de 6 mois dont la mère a consommé quotidiennement du jus de carotte les dernières semaines de gestation (Mennella et al, 2001), chez le lapereau au sevrage avec l'ajout de baie de genévrier dans l'alimentation de la mère pendant la deuxième moitié de la gestation (Bilko et al, 1994), chez l'agneau de quelques mois avec l'ajout d'huile essentielle d'origan en fin de gestation (Simitzis et al, 2007) et chez la chèvre au moment du sevrage avec l'ajout d'herbe du Laos en fin de gestation (Hai et al, 2012) (Figure 20).



**Figure 20** : Graphique montrant la consommation en herbe du Laos chez des chèvres issues de mères non odorisés (Control) ou odorisées (COLM) pendant la gestation - \* :  $p < 0,5$  ; \*\* :  $p < 0,01$  – adapté de [Hai et al, 2012](#).

L'ensemble de ces études montre qu'une exposition odorante pendant la gestation via une injection directe dans le liquide amniotique ou via l'alimentation ou la boisson de la mère induit une préférence pour la consommation de nourriture ou de boisson odorisée avec le même composé chez le jeune au sevrage et à plus long terme à l'âge adulte.

Il est à noter que d'autres fenêtres temporelles et matrice d'exposition odorante, comme la lactation ont également été étudiées et induisent des effets comparables sur les consommations.

Par exemple, Mennella et ses collaborateurs ont montré que la préférence pour une nourriture complétée avec du jus de carottes est observée si les mères ont consommé du jus de carottes pendant les 2 premiers mois de lactation ([Mennella et al, 2001](#)). Chez le chat, Hepper et ses collaborateurs induisent une préférence pour de la nourriture odorisée avec de la vanilline ou une odeur de « fumé » chez des chatons de 10 semaines, puis de 6 mois, que les mères aient consommé la nourriture odorisée avec les 2 mêmes odorants uniquement pendant la lactation ou pendant la fin de gestation puis la lactation ([Hepper et al, 2012](#)). De même chez le chaton de 45 jours ([Becques et al, 2009](#)) et le lapereau à l'âge du sevrage avec une odorisation via l'alimentation de la mère pendant ces deux périodes.

Une exposition odorante uniquement pendant la période de lactation ou cumulée pendant la gestation et la lactation semble donc suffisante pour influencer le comportement alimentaire chez le jeune au sevrage et à l'âge adulte.

Ainsi une exposition odorante via l'alimentation ou la boisson de la mère pendant la période de gestation, de lactation ou les 2 cumulées influence les préférences médiées par l'olfaction et les odeurs alimentaires du nouveau-né et du jeune et les préférences alimentaires du jeune au sevrage et à l'âge adulte.

## **II. Exposition odorante et effets sur la plasticité du système olfactif**

Comme nous avons pu le voir dans le chapitre I, chez les mammifères, l'apparition des NSOs dans l'EO et des glomérules dans le BO se fait de façon précoce au cours du développement prénatal, puis se poursuit au cours du développement postnatal et finalement s'achève à des âges différents en fonction de l'espèce, de la lignée et de l'OR concerné. Ceci a été particulièrement étudié dans des lignées transgéniques permettant de suivre la maturation des glomérules au cours du temps. Par exemple chez la souris, les glomérules M71 et M72 apparaissent en nombre multiple, de petite taille, sur 2 parties de chaque bulbe et sont innervés par les axones de NSOs exprimant M71 ou M72 et d'autres ROs. Puis au cours de la maturation, les glomérules surnuméraires vont peu à peu disparaître, pour finalement aboutir à une structure mature de quatre glomérules uniques, 2 par BO, de plus grande taille que les glomérules immatures, qui sont alors innervés seulement par des NSOs exprimant M71 ou M72 (Zou et al, 2004).

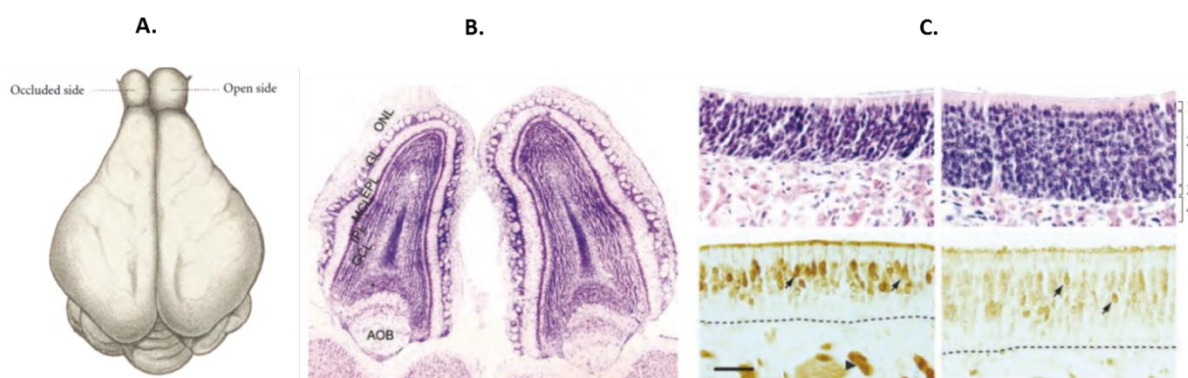
Les glomérules innervés par les axones des NSOs exprimant MOR29A vont quant à eux totalement disparaître de la partie ventrale du BO et ne persister qu'en partie dorsale (Nakatani et al, 2003).

Les glomérules vont donc subir une maturation au cours de leur développement postnatal, mettant ainsi en jeu des remaniements au niveau des connexions axonales. Sachant également que des ROs sont exprimés au niveau des axones des NSOs (Barnea et al, 2004 ; Strotmann et al, 2004 ; Imai et Sakano, 2007) et qu'il a été montré que ces ROs joueraient un rôle dans le guidage axonal (Wang et al, 1998 ; Feinstein et Mombaerts, 2004), des modifications au niveau de l'activité des NSOs, suite à un blocage sensoriel ou au contraire une stimulation excessive, pendant les phases de développement pré- et post-natal, pourraient affecter ces remaniements axonaux et apporter des modifications au niveau de la maturation des glomérules.

## A. Modifications des projections axonales induites par une diminution de l'activité neuronale olfactive au cours du développement des glomérules.

### 1) Modifications engendrées par la suture d'une narine à la naissance

Diverses études se sont intéressées aux conséquences d'une occlusion nasale, par suture d'une narine les jours suivant la naissance, sur le développement de la MO et du BO chez le rongeur. Des changements majeurs au niveau de la structure du BO ont été observés, incluant une diminution générale de sa taille (Benson et al, 1984 ; Brunjes, 1994) (Figure 21 A.), et plus particulièrement une diminution de l'épaisseur de la couche plexiforme externe et de la couche granulaire (Baker, 1990 ; Frazier et Brunjes, 1988) (Figure 21 B.). Au niveau de la MO, l'occlusion nasale conduit à une diminution générale de l'épaisseur de la MO (Figure 21 C.) et de la régénération neuronale (Cummings et Brunjes, 1994 ; Farbman et al, 1988).

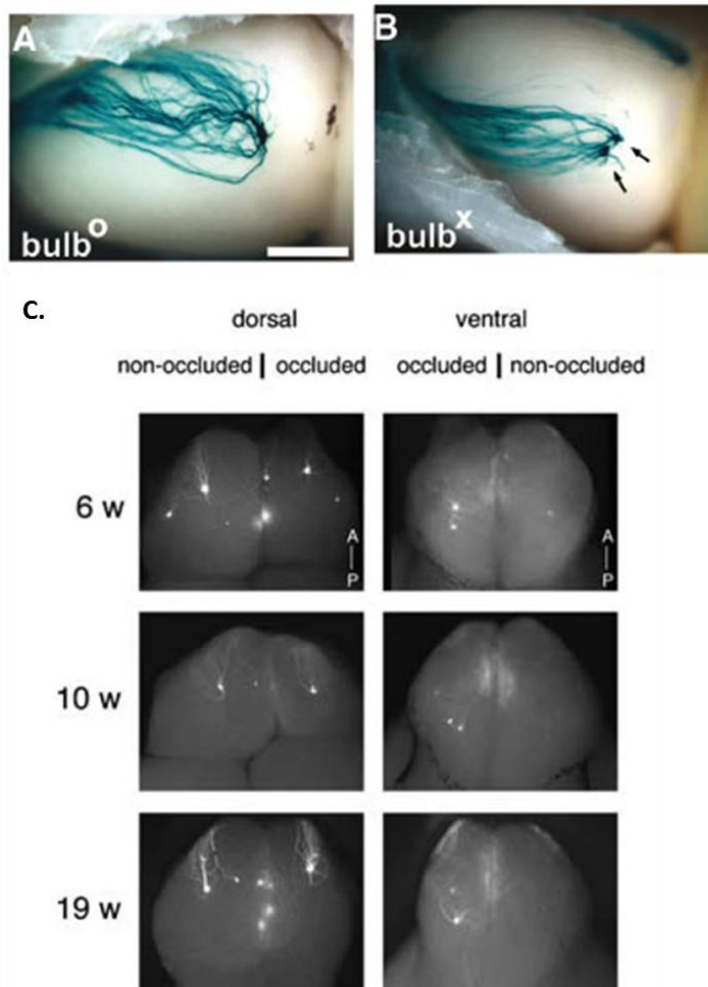


**Figure 21** : Conséquences de la suture permanente d'une narine pendant la période critique du développement sur la structure du BO et de la MO – **A.** Schéma du cerveau d'un jeune lapin ayant subi une suture de narine (côté gauche) depuis la naissance – la taille du BO du côté de la narine suturée est diminuée – **B.** Coupe horizontale des BOs d'une jeune souris ayant subi une suture de narine (côté gauche) depuis la naissance – les différentes couches du BO du côté de la narine suturée sont plus fines que celles du côté de la narine ouverte – **C.** Coupes histologiques de MO d'une jeune souris ayant subi une suture de narine (côté gauche) depuis la naissance – images de gauche : côté suturé – images de droite : côté ouvert – images du haut : coloration Hematoxyline / Eosine – images du bas : immunomarquage OMP - diminution générale de l'épaisseur de la MO du côté suturé par rapport au côté ouvert - les flèches pointent des NSOs matures - adapté de Coppola, 2012.



Au niveau des projections axonales glomérulaires, la suture permanente d'une narine à partir des jours suivant la naissance provoque une réorganisation, conduisant à une absence de maturation des glomérules (Zou et al, 2004). Du fait que les projections axonales des NSOs de la MO vers le BO se font de façon ipsilatérale, ce modèle de suture d'une narine permet d'avoir un contrôle interne avec le bulbe placé du côté de la narine non suturée. Les souriceaux opérés de plus de quarante jours présentent effectivement deux glomérules uniques situés en zone médiane et latérale du BO communiquant avec la narine non suturée, et innervés uniquement par les axones des NSOs exprimant M71 ou M72 (**Figure 22 A.**), c'est-à-dire le même schéma structural de glomérule mature observé chez des animaux non opérés. Mais du côté de la narine suturée, on observe des glomérules multiples, innervés par les axones de NSOs exprimant M71 ou M72 et différents autres ROs, c'est-à-dire un schéma structural de glomérule immature observé chez des animaux n'ayant subi aucune manipulation (**Figure 22 B.**). D'après les auteurs, la diminution des stimulations odorantes engendrée par la suture permanente d'une narine pendant la période critique du développement post-natal semble donc empêcher la maturation des glomérules M71 et M72.

Ce phénomène d'absence de maturation a également été observé pour les glomérules innervés par les axones de NSOs exprimant le RO transgénique TgMOR29A. Nakatani et ses collaborateurs, après avoir quant à eux étudié la maturation des glomérules ectopiques innervés par les axones des NSOs exprimant le RO TgMOR29A lors du développement postnatal chez un lignée de souris (Cf chapitre I partie IV), ont également suturé de façon définitive une narine sur des souris de cette lignée 5 jours après la naissance (Nakatani, 2003). Les auteurs ont ainsi observé qu'il n'y avait plus de disparition des projections axonales ectopiques des NSOs exprimant TgMOR29A dans la partie ventrale du BO situé du côté de la narine suturée chez des souriceaux de plus de 4 semaines, contrairement au BO situé du côté de la narine non suturée (**Figure 22 C.**).



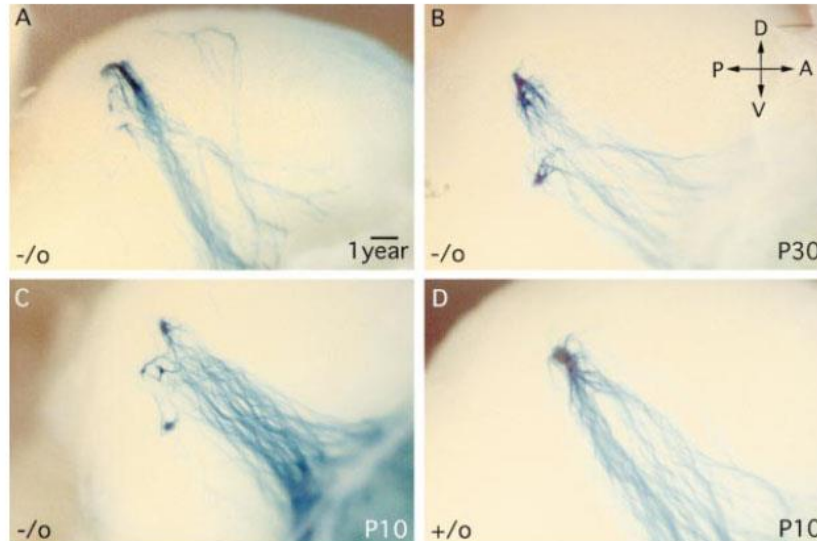
**Figure 22** : Modifications des projections axonales glomérulaires engendrées par la suture d'une narine pendant la période critique du développement - **A.** et **B.** : Perturbation de la maturation du glomérule M71 induite par la suture d'une narine - **A.** Glomérule M71 unique coloré X-gal à PN40 sur BO entier du côté de la narine non suturée - **B.** Glomérule M71 multiple coloré X-gal à PN40 sur BO entier du côté de la narine suturée – barre d'échelle = 0,5 mm – adapté de [Zou et al, 2004](#) - **C.** Absence de disparition des projections axonales ectopiques des NSOs exprimant TgMOR29A au niveau du glomérule ventral après suture unilatérale d'une narine – images de gauche : glomérule dorsal, images de droite : glomérule ventral - images du haut : animaux de 6 semaines, images du milieu : animaux de 10 semaines et images du bas : animaux de 19 semaines - adapté de [Nakatani et al, 2003](#).

Ces deux études montrent donc qu'une baisse de la stimulation odorante due à la suture définitive d'une narine au cours du développement des glomérules induit des modifications au niveau des projections axonales des NSOs vers le BO, entraînant, d'après l'interprétation des auteurs, une absence de maturation des glomérules. Cependant, la diminution de l'apport odorant s'accompagne d'effets compensatoires moléculaires et fonctionnels décrits du côté de la narine suturée, ce qui complique l'analyse des résultats. Une revue récente de Coppola pointe notamment le fait que la suture d'une narine n'entraîne pas

qu'une déprivation sensorielle. D'une part cette déprivation sensorielle ne semble que partielle du côté de la narine suturée, et d'autre part la limitation de l'entrée d'air dans cette narine protège la MO de la toxicité oxydative et permet un maintien constant de l'humidité, ce qui limiterait le phénomène d'apoptose au niveau de la MO du côté obstrué (Coppola, 2012). De plus, il semblerait qu'il y ait une période critique lors du développement, au cours de laquelle la suture d'une narine provoque les modifications structurales du BO décrites dans la littérature. En effet, Brunjes et Borrer ont montré chez le rat qu'une suture pratiquée entre PN1-30 induirait une diminution typique de 25% de la taille du BO du côté de la narine suturée alors qu'une suture effectuée entre PN30-60 ou PN60-90 n'aurait que des effets mineurs (Brunjes et Borrer, 1983). Ces travaux sont à mettre en parallèle avec l'étude de Ma et ses collaborateurs, qui ont mis en évidence qu'une diminution de l'activité neuronale pendant la première semaine suivant la naissance perturbe de manière durable la mise en place des cartes glomérulaires, chez 3 lignées de souris transgéniques différentes (Ma et al, 2014). Les modifications des projections axonales glomérulaires observées suite à la suture d'une narine pendant la période critique du développement pourraient donc résulter d'un délai dans le processus de maturation plus important comme l'ont évoqué les auteurs des 2 études citées, mais également pourraient correspondre à un remaniement permanent, conduisant à un changement définitif de la carte glomérulaire

## 2) Blocage de la transduction du signal olfactif dès la naissance

Zheng et ses collaborateurs ont montré qu'un blocage de la transduction du signal olfactif engendrait des effets semblables à ceux induits par la suture d'une narine, avec notamment une réorganisation des projections axonales vers les glomérules. Ces derniers ont bloqué l'activité neuronale olfactive par mutagenèse dirigée au niveau du gène codant pour la sous unité OCNC1 d'un canal activé par des nucléotides cycliques (CNG), un des effecteurs principaux de la transduction du signal suite à une stimulation olfactive (Cf chapitre I), bloquant ainsi la transduction du signal olfactif de l'ensemble des NSOs dans une lignée de souris transgéniques *M72-LacZ*. Grâce au marquage LacZ des NSOs exprimant M72, les auteurs ont pu observer un blocage de l'activation calcique des NSOs M72 associé à des perturbations au niveau des projections axonales M72 : des glomérules M72 additionnels, de petite taille sont présents dans la zone ventrale du BO, caractéristiques structurales d'une absence de maturation (Zheng et al, 2000) (Figure 23).



**Figure 23** : Perturbation de la maturation du glomérule M72 induite par une mutation dans le gène OCNC1 – Coloration X-gal sur bloc entier BO gauche souris *M72-LacZ* - **A.** Glomérule M72 chez souris de 1 an présentant la mutation – **B.** Glomérule M72 chez souris PN30 présentant la mutation – **C.** Glomérule M72 chez souris PN10 présentant la mutation – **D.** Glomérule M72 chez souris PN10 ne présentant pas la mutation – PN10 : présence d’un glomérule unique chez les souris ne présentant pas de mutation, PN10-365 persistance des glomérules multiples chez les souris mutantes OCNC1-, barre d’échelle = 80  $\mu$ m – adapté de [Zheng et al, 2000](#).

Le blocage de la transduction du signal olfactif induit donc également des modifications au niveau des projections axonales M72, se traduisant par une absence de maturation des glomérules M72, qui conservent une structure immature composée de glomérules multiples et de petites tailles.

De façon surprenante, ces auteurs ont effectué une mutation analogue au niveau de la sous-unité du canal activé par des nucléotides cycliques dans la lignée P2-IRES-taulacZ. Chez ces souris, le blocage de la transduction du signal olfactif n’induit aucune modification au niveau des projections axonales des NSOs exprimant P2. Une étude menée par Lin et ses collaborateurs sur des souris de la même lignée P2-IRES-taulacZ présentant la même mutation a confirmé ce résultat ([Lin et al, 2000](#)).

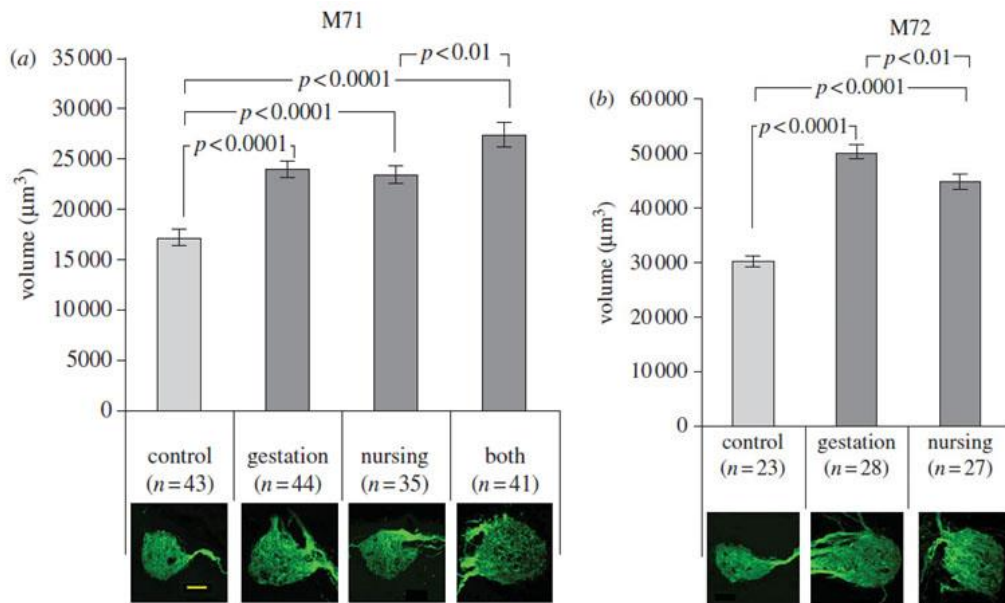
Le blocage de la transduction du signal olfactif a donc des effets variables sur les projections axonales, en fonction du RO exprimé par les NSOs. Pour certains RO comme M71 et M72, ce blocage peut induire une absence de maturation des glomérules et pour d’autres RO comme P2, il n’y a aucun effet sur les projections axonales.

## **B. Modifications des projections axonales induites par un changement dans l'environnement olfactif au cours du développement des glomérules.**

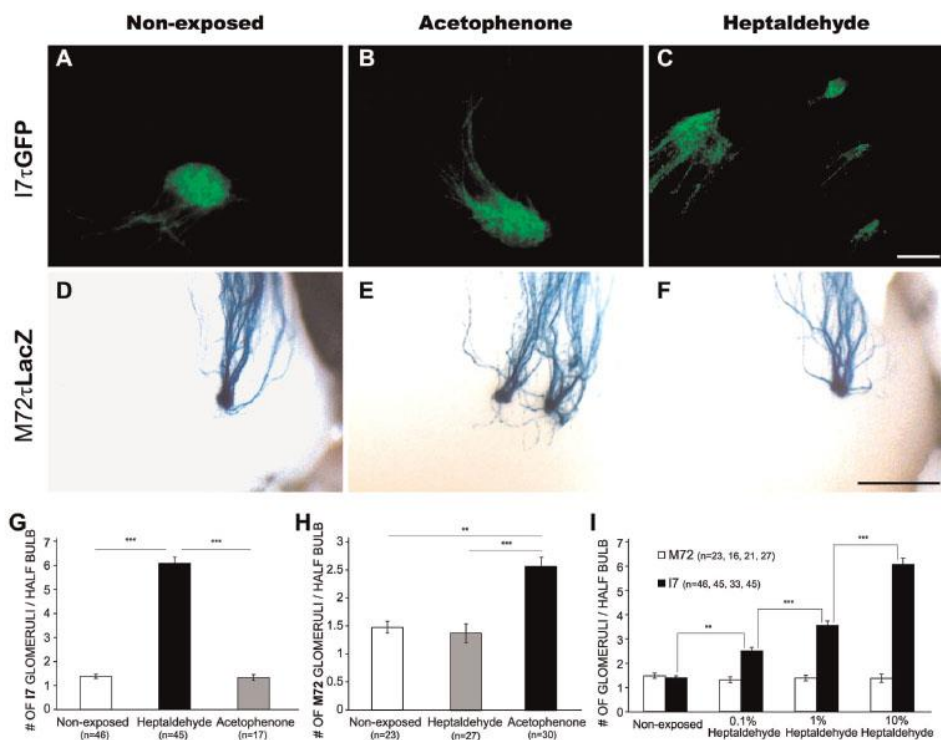
Nous venons de voir dans le paragraphe précédent les effets d'un blocage de l'activité neuronale olfactive par suture d'une narine ou par blocage de la transduction du signal pendant la période critique du développement. Nous allons maintenant analyser, au travers de 3 études, les effets d'une stimulation odorante sur le développement des glomérules.

Dans ces 3 études, les auteurs ont montré qu'une exposition odorante périnatale pouvait induire des modifications au niveau de la taille et du nombre de glomérules du BO.

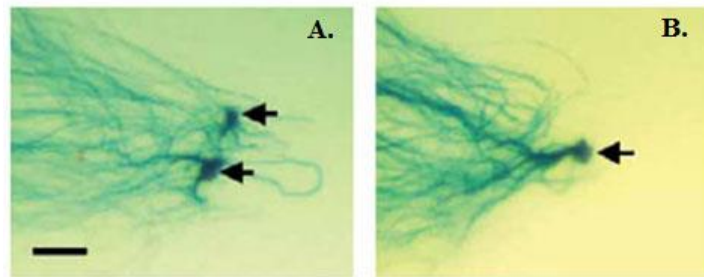
Ainsi, Todrank et ses collaborateurs ont montré un effet sur la taille des glomérules : une exposition à l'acétophénone 1%, un des ligands du RO M71, via l'alimentation de la mère, pendant la gestation, la lactation, ou les 2 périodes cumulées, va entraîner une augmentation de la taille des glomérules M71 chez des souriceaux *M71-GFP* de 3 semaines. De façon surprenante, cet effet n'a été retrouvée que suite à 2 périodes d'exposition, gestation uniquement ou lactation uniquement, chez des souriceaux *M72-GFP* pré-exposés avec de l'isopropyl tiglate 1%, un des ligands préférentiels du RO M72 (Todrank et al, 2011) (**Figure 24**). Valle-Leija et ses collaborateurs ont quant à eux montré un effet sur le nombre de glomérules : ils ont mis en évidence l'apparition odorant-spécifique et dose-dépendante de glomérules multiples I7 et M72, avec généralement un glomérule principal de taille moyenne et plusieurs glomérules surnuméraires de petite taille, chez des souris *I7-GFP / M72-LacZ* à PN20, exposées quotidiennement via l'environnement (papier filtre imbibé dans la cage jusqu'à 10%) depuis leur naissance (Valle-Leija et al, 2012) (**Figure 25**). Enfin, Kerr et Belluscio ont montré que le contexte dans lequel s'effectue l'exposition odorante semble également jouer un rôle. En effet, en exposant dès la naissance des souriceaux d'une lignée *rI7→M71* quotidiennement via l'environnement (imprégnation de mamelle de la mère) avec un odorant connu pour activer le RO I7 et aversif pour la souris (octanal à 1%), ils ont observé la disparition des glomérules exogènes *rI7* surnuméraires chez des souriceaux à PN13 ayant été pré-exposés, plus rapide que chez des souriceaux contrôles (Kerr et Belluscio, 2006) (**Figure 26**).



**Figure 24** : Histogrammes montrant les moyennes des volumes des glomérules normalisées avec le poids des souriceaux, en fonction de la période d'exposition odorante : contrôle = non exposé, ou exposé pendant la gestation, la lactation (nursing) ou les 2 (both) et images de glomérules M71 et M72 représentatives de chaque condition expérimentale – gauche : souris M71-GFP, droite : M72-GFP - barre d'échelle = 20 μm – adapté de [Todrank et al, 2011](#).



**Figure 25** : Formation de glomérules surnuméraires suite à une exposition odorante postnatale chez 2 lignées de souris transgéniques I7tauGFP et M72tauLacZ – barre d'échelle = 100 μm (I7tauGFP) et 500 μm (M72tauLacZ) – adapté de [Valle-Leija et al, 2012](#).



**Figure 26** : Disparition des glomérules multiples à PN13 suite à une exposition odorante postnatale chez la lignée de souris transgéniques rI7→M71 – A. souriceaux non exposé – B. souriceau exposé - barre d'échelle = 100  $\mu\text{m}$  – adapté de [Kerr et Belluscio, 2006](#).

Les résultats obtenus dans ces 3 études pointent à nouveau l'existence d'une période critique, au cours de laquelle une modification de l'activité sensorielle peut induire une plasticité au niveau du BO (Cf ce chapitre II. A. 1)).

En effet, Todrank et ses collaborateurs ont de plus montré qu'une exposition odorante uniquement pendant la fin de gestation (PN10-20) n'entraînait pas de modification au niveau de la taille des glomérules. Dans l'étude de Valle-Leija et ses collaborateurs, les glomérules surnuméraires observés à PN20 persistent chez des souris adultes (PN50), malgré l'arrêt de l'exposition odorante à PN20, ce qui suggère donc un changement de conformation stable suite à une exposition odorante postnatale, et montre que la période périnatale est une période critique dans la mise en place des réseaux neuronaux. Néanmoins, le volume total des glomérules étant identique entre des souriceaux pré-exposés ou non, le nombre de projections axonales ne semble donc pas modifié. Seule la cartographie glomérulaire serait perturbée. Cet effet est observé pour une exposition odorante ciblant les glomérules M72 qui n'apparaissent que pendant la période postnatale (ils sont observables chez des souriceaux à PN10 mais pas à PNO, [Zou et al, 2004](#)), et pour les glomérules I7 déjà formés dès la naissance. Ceci suggère que la formation de ces glomérules I7 surnuméraires, sous l'effet de l'exposition odorante, pourrait avoir lieu en post-natal après la formation initiale prénatale des glomérules I7.

De façon surprenante, l'effet observé par ces auteurs sur la structuration des glomérules M72, engendré par une exposition odorante postnatale, n'est pas le même que celui observé par l'équipe de Todrank. Les éléments qui diffèrent entre ces deux études sont la lignée de souris transgénique utilisée, *M72-GFP* ou *I7tauGFP/M72tauLacZ*, et la voie d'odorisation, via l'alimentation de la mère ou l'environnement.

Ainsi les effets d'une exposition odorante sur la maturation des glomérules pendant la période de développement ont été abordés dans quelques études qui montrent des différences

notables selon la lignée, l'odorant et sa valence pour l'animal, ou la fenêtre d'exposition. De plus, les auteurs se sont essentiellement intéressés à la période suivant la naissance. Du fait de l'hétérogénéité des résultats obtenus, d'autres études sont nécessaires sur d'autres populations de NSOs exprimant d'autres ROs pour savoir si les différences observées au niveau sont engendrées par les mêmes mécanismes (Valle-Leija, 2015).

### C. Autres effets d'une exposition odorante périnatale

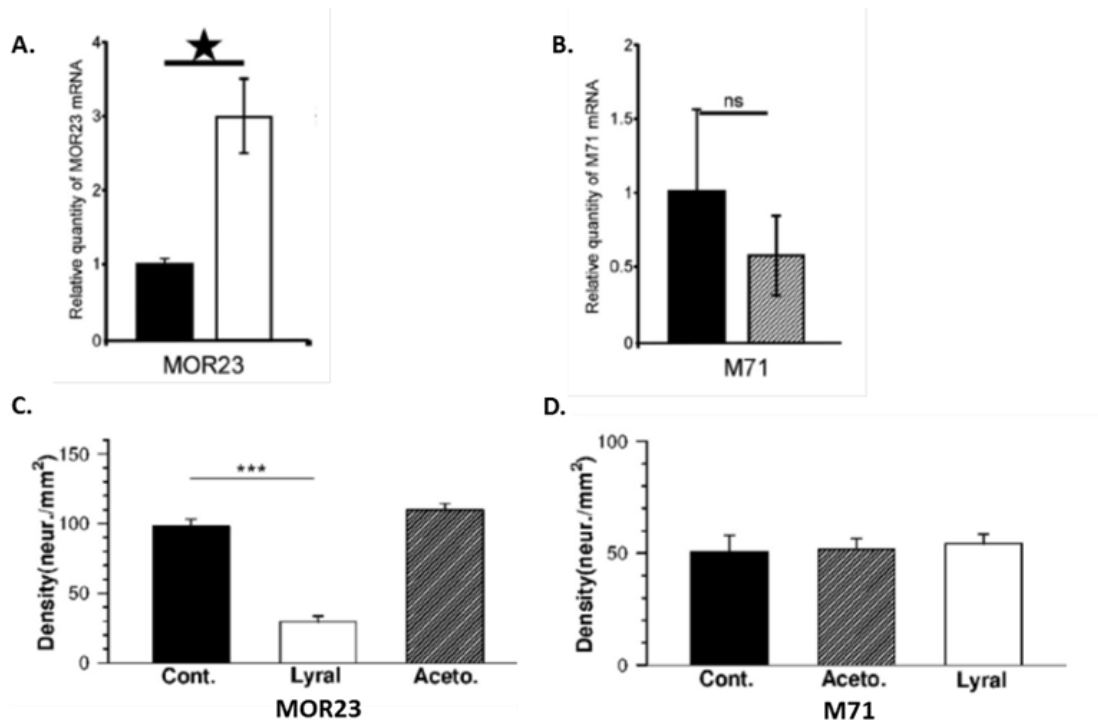
#### 1) Effets d'une exposition odorante postnatale sur l'expression des récepteurs olfactifs de l'EO septal

La modification de la structure et/ou de la taille des glomérules suite à une exposition odorante périnatale peut avoir différentes origines. L'une de ces origines serait une modification du nombre de NSOs dans la MO impactant le nombre d'axones, car il a été montré récemment par la comparaison de différentes lignées de souris transgéniques que la taille du glomérule est proportionnelle au nombre de NSOs chez l'adulte (Bressel et al, 2016).

Une seule étude a analysé les effets d'une exposition odorante pendant la période du développement sur l'expression des récepteurs olfactifs dans la MO. Ainsi des souriceaux des lignées *MOR23-GFP* et *M71-GFP* exposés quotidiennement via l'environnement (imprégnation de mamelle de la mère), à des odorants connus pour activer ces deux récepteurs (lyral pour MOR23 et acétophénone pour M71) jusqu'à PN21 montrent une absence d'effet sur le niveau d'expression des récepteurs MOR23 et M71 dans l'EO septal par qPCR. Une analyse réalisée sur quelques neurones GPF+, donc exprimant MOR23, prélevés au niveau de l'EO septal de souriceaux *MOR23-GFP*, a permis de mettre en évidence une augmentation du niveau d'expression des ARNm codant pour le récepteur MOR23 chez des souriceaux exposés au lyral. Mais par contre, les niveaux d'expression des ARNm codant pour le récepteur M71 chez les souriceaux sont identiques entre animaux exposés ou pas à l'acétophénone quelle que soit la méthode d'analyse (Cadiou et al 2014) (Figure 27 A. et B.). Parallèlement à cela, les auteurs ont également mis en évidence une diminution de la densité en NSOs exprimant MOR23 dans l'EO septal après une odorisation au lyral, ce qui pourrait expliquer l'augmentation du niveau d'expression des ARNm codant pour le récepteur MOR23 dans ces NSOs : maintenir un même niveau d'expression en ARNm MOR23 avec



moins de NSOs. Aucune différence de densité en NSOs exprimant M71 n'a été observée chez les souriceaux M71 exposés à l'acétophénone (**Figure 27 C. et D.**).



**Figure 27 :** Epithélium septal de souriceaux *MOR23-GFP* et *M71-GFP* exposés ou non en postnatal au lyral ou à l'acétophénone : expression des RO MOR23 et M71 dans quelques NSOs et densité des NSOs MOR23 et M71 sur le bloc entier – **A.** et **B.** Histogrammes montrant les quantités relatives d'ARNm MOR23 et M71 - barre noire : souriceaux non exposés, barre blanche : souriceaux exposés au lyral et barre hachurée : souriceaux exposés à l'acétophénone **A.** Souriceaux *MOR23-GFP* et **B.** Souriceaux *M71-GFP* - **C.** et **D.** Histogrammes montrant les densités de NSOs MOR23 et M71 – barre noire : souriceaux non exposés, barre blanche : souriceaux exposés au lyral et barre hachurée : souriceaux exposés à

## 2) Effets d'une exposition odorante prénatale ou postnatale sur l'amplitude de réponse des NSOs.

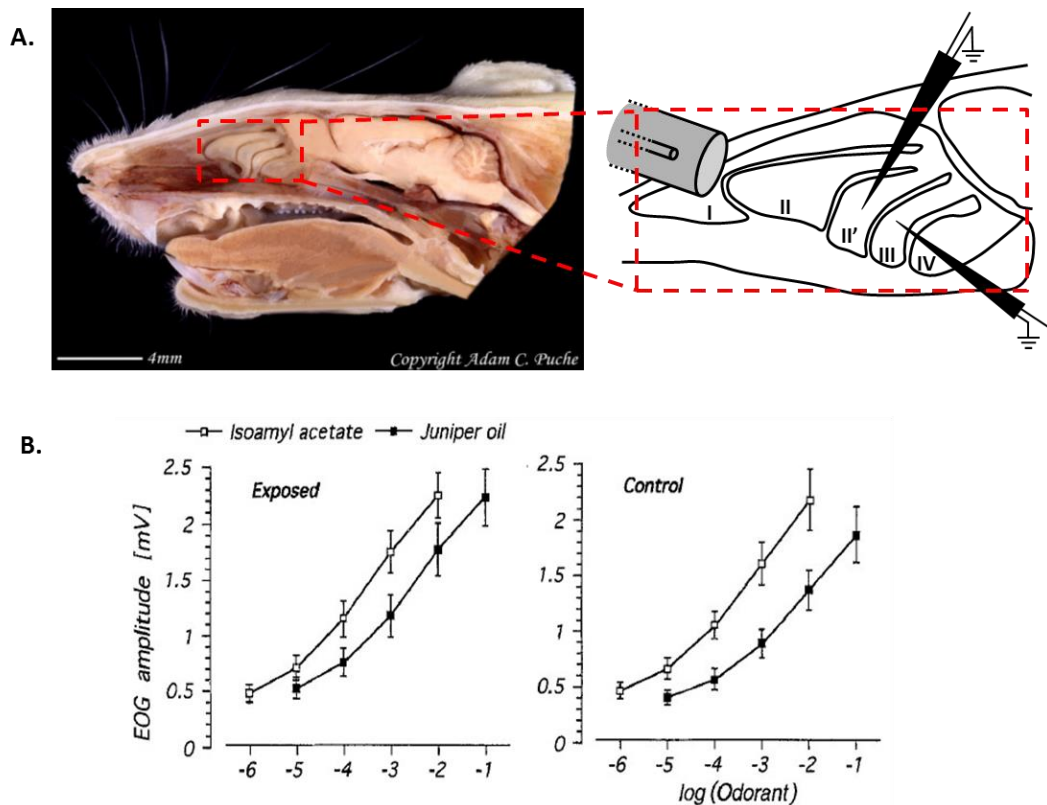
Peu d'études ont mesuré les effets d'une exposition odorante pendant la période du développement périnatale sur la sensibilité de la muqueuse olfactive, et toutes ne sont pas concordantes entre elles. La plupart des études utilisent l'électro-olfactogramme pour mesurer l'amplitude du signal électrique d'une population de cellules sur une héli-muqueuse olfactive suite à l'application d'un odorant, en général appliqué en gamme de concentration croissante

**(Figure 28 A.)** L'amplitude du signal obtenu permet de déterminer le niveau de sensibilité de la zone concernée à l'odorant.

Tout d'abord, Semke et ses collaborateurs ont exposé quotidiennement des lapereaux avec du genévrier en ajoutant de ces baies dans l'alimentation de la mère uniquement pendant la gestation, puis réalisé des électroOlfactoGramme (EOG) sur l'EO septal de ces lapereaux. Ils ont montré que la préférence pour l'odeur du genévrier chez des lapereaux entre PN1 et 8 exposés pendant la gestation (Cf ci-dessus) était associée à une augmentation de l'amplitude de réponse des NSOs de l'EO septal après une stimulation avec de l'huile de genévrier, par rapport aux contrôles non odorisés ([Semke et al, 1995](#)) (**Figure 28 B.**).

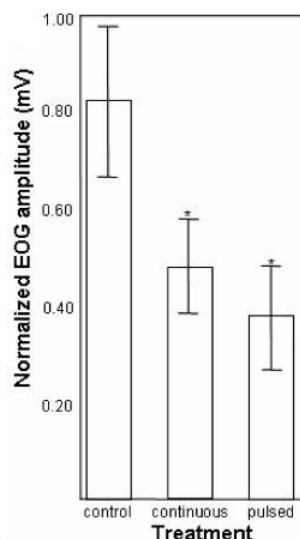
Des souris adultes, montrant une très faible sensibilité pour un odorant (androstenone), exposées pendant plusieurs semaines à cet odorant (coton imbibé dans la cage), puis enregistrées en EOG ont montré une augmentation de l'amplitude de réponse à une stimulation avec ce même odorant par rapport à des souris non exposées ([Wang et al, 1993](#)). Cependant, les résultats obtenus en EOG pour des souris montrant à la base une sensibilité pour l'androsténone, ont été les mêmes avec ou sans exposition préalable avec cet odorant.

Dans l'étude de Cadiou et ses collaborateurs, citée ci-dessus (Cf ce chapitre II C. 1)), aucune différence d'amplitude de réponse à des stimulations au lyral, effectuées en EOG sur de l'épithélium septal, n'a été observée entre des souriceaux *MOR23-GFP* pré-exposés ou non au lyral (exposition postnatale PN0 à PN21 via l'environnement – 1h / jour). Mais avec des enregistrements en patch-clamp sur neurone unique, les auteurs ont montré qu'une exposition postnatale au lyral augmentait la sensibilité des NSOs MOR23 à l'application de faible concentration en lyral. Cet effet n'a pas été retrouvé pour la sensibilité à l'acétophénone des NSOs M71 ([Cadiou et al, 2014](#)). L'effet observé est donc spécifique du RO et dépend de l'odorant utilisé au cours de l'exposition.



**Figure 28** : ElectroOlfactoGramme (EOG) : principe et résultats obtenus dans l'étude de Semke et ses collaborateurs – **A.** Photo d'une hémis-tête de rat en coupe sagittale et schéma du dispositif utilisé pour les enregistrements, positionnement des électrodes d'enregistrement – **B.** Graphique montrant l'amplitude de réponse des NSOs de l'EO septal en fonction du log de la concentration en odorants (acétate d'isoamyl et huile de genévrier) – à gauche : animaux exposés pendant la période postnatale au genévrier, à droite : animaux contrôles non exposés – adapté de [Semke et al, 1995](#).

Barbour et ses collaborateurs, ont quant à eux, montré un effet contraire à celui observé dans ces 3 études. Une exposition postnatale à l'octanal entre PN10 et PN31 via l'environnement, soit de façon continue, soit de façon pulsée (4 séquences de 15 minutes par jour) a conduit à une diminution de l'amplitude de réponse des NSOs de la MO enregistrée en EOG, suite à une stimulation avec une faible concentration en octanal chez ces 2 groupes de souriceaux pré-exposés. Ces expositions quotidiennes à l'octanal pendant la période post-natale se traduirait donc par une désensibilisation des NSOs de la MO pour cet odorant ([Barbour et al, 2008](#)) (**Figure 29**).



**Figure 29** : Electroolfactogramme (EOG) : Amplitude de réponse des NSOs de la MO suite à une stimulation à l’octanal dilué au 1:20000 (v:v) pour 3 groupes de souriceaux : « continuous » = souriceaux exposés à l’octanal en continu via l’environnement entre PN10-31, « pulsed » = souriceaux exposés à l’octanal en pulse (4 x 15 min / jour) via l’environnement entre PN10-31 et « control » = souriceaux non exposés à l’octanal – adapté de [Barbour et al, 2008](#).

Ces différentes études montrent qu’une exposition odorante périnatale peut également induire des modifications au niveau de la sensibilité de la MO, spécifique de l’odorant utilisé pendant l’exposition, mais ne semble pas influencer majoritairement le profil d’expression des ROs dans la MO. Néanmoins, compte-tenu du peu d’études menées sur l’analyse de ces effets, il paraît difficile d’émettre des conclusions.

#### **D. Exposition odorante périnatale et modulation du stress**

Plusieurs études menées chez l’adulte ont montré que l’inhalation de certaines odeurs pouvait moduler positivement l’état de stress des individus, en agissant négativement sur l’axe HPA (hypothalamo-hypophysio-surrénalien), dont l’activation, en réponse à un stress, se traduit par une augmentation rapide du taux d’ACTH dans le plasma ([Aguilera, 1994](#) ; [McEwen et al, 1986](#)) et une hyperthermie ([Cabanac et Briese, 1992](#) ; [Shibata et Nagasaka, 1982](#)).

Chez l’homme, Fukui et ses collaborateurs ont montré qu’une exposition aiguë à une odeur artificielle (odeur de musc, de rose ou odeur florale), via l’environnement, induit une diminution du taux de cortisol salivaire après 40 minutes d’exposition, par rapport à des individus non exposés ([Fukui et al, 2007](#)). Chez le rat, il a également été montré que dans des

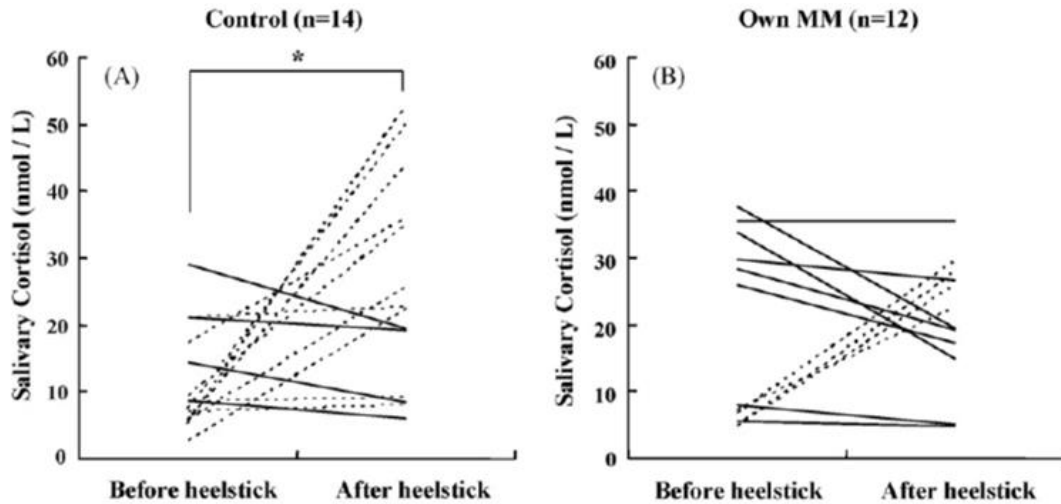
conditions stressantes, l'inhalation d'une odeur artificielle pouvait également abaisser l'état de stress. En effet, une diminution du taux d'hormone corticotrope circulante (ACTH) dans le plasma, hormone libérée suite à un stress, et une suppression de l'hyperthermie corporelle, induite également suite à un stress, ont été observées chez des rats adultes soumis à un stress d'immobilisation en présence de la « green odor » (mélange de trans-2-hexenal et cis-3-hexenol) (Nakashima et al, 2004) ce qui a été confirmé par deux autres études (Akutsu et al, 2002 et 2003).

Cet effet notable d'un point de vue comportemental et biochimique sur la modulation du stress chez des individus adultes est décrit pour certaines odorants synthétiques et les mécanismes mis en jeu sont mal connus. Le niveau de familiarisation de l'animal à l'odeur utilisée semble également jouer un rôle important. Comme je l'ai déjà mentionné ci-dessus (Cf chapitre II, partie II., D.), quelques études ont montré chez l'humain que des odeurs biologiques, en particulier celles rencontrées *in utero*, peuvent aussi avoir un effet apaisant pour le nouveau-né. Ainsi, les odeurs de liquide amniotique et de lait maternel vont induire un effet comportemental positif chez des nouveau-nés soumis à un stress en leur présence, se traduisant par une diminution des pleurs (Badiee et al, 2013 ; Nishitani et al, 2009 ; Varendi et al, 1998) et une stabilisation du taux de cortisol salivaire, avant et après l'application d'un stress en présence de l'odeur du lait maternel (Badiee et al, 2013 ; Kawakami et al, 1997) (**Figure 30**). Une telle stabilisation a également été retrouvée avant et après l'application d'un stress réalisé en présence de l'odeur du lait maternel.

Dans deux autres études menées chez l'humain, on observe une diminution des pleurs chez des nouveau-nés familiarisés pendant la période postnatale avec l'odeur de vanille lorsqu'ils sont soumis à un prélèvement sanguin au niveau du talon en présence de l'odeur de vanille (Goubet et al, 2007 ; Rattaz et al, 2005). Une odeur artificielle rencontrée pendant la période postnatale va donc pouvoir moduler le comportement de stress du nouveau-né lorsqu'il est soumis à des conditions stressantes.

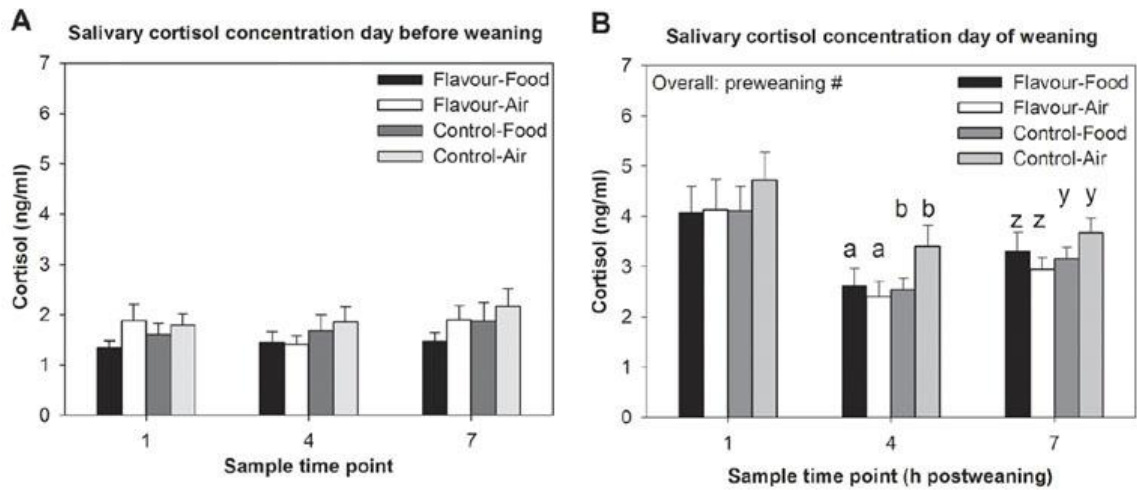
Cet effet semble aussi possible pour une odeur apprise dans la période périnatale. Une étude récente menée chez la souris a montré qu'une exposition périnatale à une odeur artificielle via l'environnement pouvait modifier l'état de stress des souriceaux. Ainsi une exposition à l'odeur conférée par du papier journal, utilisé comme litière dans la cage des souris pendant la période de fin de gestation et les 3 premières semaines de lactation, va induire une diminution du taux d'hormone corticotrope (ACTH) chez des souriceaux de 6 semaines, soumis à un stress (présentation d'une odeur de prédateur, 2,5-dihydro-2,4,5-trimethylthiazoline, TMT), en sa présence (Matsukawa et al, 2016). La valence de l'odeur du

papier journal, à la base neutre pour l'animal, est devenue positive après une exposition chronique périnatale. L'animal va l'associer à l'odeur du nid maternel, perçue alors comme une odeur apaisante.



**Figure 30** : Graphiques représentant l'évolution du taux de cortisol salivaire individuel avant et après le prélèvement sanguin au niveau du talon – **A.** Control = groupe contrôle, prélèvement effectué sans odeur ajoutée – **B.** Own MM = groupe expérimental, prélèvement effectué en présence de l'odeur du lait de la mère du nouveau-né testé – adapté de [Nashitani et al, 2009](#).

Une seule étude menée chez le porc a étudié les effets d'une exposition odorante périnatale via l'alimentation sur la modulation du stress en présence de cette même odeur pendant la période du sevrage ([Oostinjer et al, 2011](#)). Des truies ont été alimentées avec une alimentation odorisée avec de l'anis pendant la fin de la gestation et la lactation. Les porcelets ont ensuite été sevrés en présence de l'odeur d'anis soit dans leur nourriture, soit dans leur environnement ou en absence de l'odeur. Une diminution du taux de cortisol salivaire 4h et 7h après le sevrage a été observée chez les porcelets ayant été exposés pendant la période périnatale à cette odeur (**Figure 31**). De plus, d'un point de vue comportemental, ces porcelets ont montré davantage de comportements de jeux et moins de comportements agressifs que des porcelets contrôles. Une exposition odorante périnatale à l'anis via l'alimentation de la mère réduirait donc l'état de stress des porcelets au moment du sevrage en présence de cette odeur familière.



**Figure 31** : Taux de cortisol salivaire **A.** : 1 jour avant le sevrage, à 1h, 4h et 7h et **B.** : le jour du sevrage à 1h, 4h et 7h – les caractères a et b indiquent des différences significatives entre les valeurs et z et y des valeurs qui tendent à être différentes - adapté de Oostinjer et al, 2011

Ces quelques études montrent qu'une exposition odorante périnatale peut induire des effets au niveau de la modulation de l'état de stress des individus, lorsqu'ils sont soumis à des conditions de stress en présence de l'odeur expérimenté *in utero*. Cet effet comportemental pourrait être lié à une régulation négative qui aurait lieu au niveau de l'axe HPA (hypothalamo-hypophysio-surrénalien).

## Chapitre IV : Problématique posée lors de la thèse

De par sa nature et sa position à l'interface avec l'environnement, le système olfactif présente une plasticité lui permettant de s'adapter aux changements rencontrés par l'animal au cours de sa vie fœtale puis postnatale en situation naturelle. Nous venons de décrire différentes études ayant permis de caractériser des modèles utilisant l'exposition odorante spécifique périnatale ou la privation odorante post-natale chez l'animal pour démontrer que la plasticité fonctionnelle, engendrée par l'activité olfactive, va induire des changements au niveau du comportement olfactif de l'individu. Chez les rongeurs, l'exposition odorante conduit majoritairement à une modification de la sensibilité périphérique de la muqueuse à l'odorant ciblé, ainsi qu'à une modification neuroanatomique affectant les glomérules et les cellules mitrales dans le bulbe, premier étage du traitement cérébral de l'information olfactive. Beaucoup de ces travaux utilisent des expositions odorantes post-natales, peu se focalisent sur l'effet d'enrichissements olfactifs *in utero*, bien que les saveurs du régime maternel et/ou des expositions environnementales puissent avoir un impact sur le fœtus via le liquide amniotique, le système olfactif étant déjà fonctionnel. Ainsi, l'exposition odorante prénatale entraîne chez la descendance de plusieurs espèces une modulation des préférences olfactives conditionnant l'acceptabilité alimentaire et la néophobie, mais aussi la résistance au stress. Cependant, les observations restent parfois contradictoires selon les modèles, les odorants, et l'interaction entre expérience olfactive et développement des préférences est peu explorée sur le plan mécanistique.

Mon projet de thèse propose d'étudier, chez la souris, les effets d'une exposition odorante prénatale et postnatale via l'alimentation maternelle sur la mise en place des préférences médiées par l'olfaction chez les jeunes jusqu'au sevrage, du fait de la plasticité structurelle et fonctionnelle du système olfactif. Afin de pouvoir suivre par imagerie les conséquences neuroanatomiques et fonctionnelles de l'exposition odorante, l'étude a été développée sur des souris transgéniques exprimant un récepteur olfactif couplé à la GFP dont le ligand est connu (*mI7-GFP*, ligand=heptanal). Jusqu'ici cette lignée a très peu été étudiée dans ce cadre. Comme nous avons pu le voir ci-dessus (Cf Chapitre III partie II] 2.2)), la formation des glomérules mI7 est effective dès la naissance et des remaniements axonaux



conduisant à la formation de glomérules surnuméraires peuvent avoir lieu dans la période postnatale (Valle-Leija et al, 2012). Nous avons donc choisi une exposition odorante pendant les deux périodes critiques du développement : la gestation et la lactation. Et nous avons décidé d'étudier ces effets dans la même tranche d'âge que l'ont fait Kerr et Belluscio, à PN12, puis à un âge un peu plus avancé, comme l'a fait l'équipe de Valle-Leija, à PN21, au moment du sevrage.

Après une phase de mise en place du modèle portant sur la validation de la présence d'heptanal dans les fluides biologiques maternels (liquide amniotique et lait), la mise en évidence d'un comportement olfactif associé à l'exposition périnatale à l'heptanal, chez le nouveau-né et les conséquences de cette exposition sur la sensibilité olfactive de la muqueuse chez le jeune, j'ai mené deux études en parallèle :

Dans la première, j'ai étudié sur les souris *mI7-GFP* adoptées les conséquences phénotypiques de l'exposition odorante périnatale chez le jeune sur les comportements médiés par l'olfaction à différents stades de développement en utilisant des tests comportementaux à base olfactive (tests d'orientation, de choix). Afin de rechercher les mécanismes impliqués dans la plasticité du système olfactif sous stimulation odorante, j'ai complété cette approche intégrée par une approche moléculaire et cellulaire à deux niveaux complémentaires:

- dans la muqueuse en étudiant les conséquences de l'exposition odorante sur la dynamique cellulaire et la survie des neurones impliqués dans la reconnaissance de l'odorant par comptage des neurones GFP par qPCR,
- dans le bulbe, le premier relai cérébral de traitement de l'information odorante, en étudiant les changements morfo-fonctionnels opérés par l'exposition odorante.

Dans la seconde étude, compte-tenu du peu d'informations disponibles sur les effets d'une exposition odorante périnatale sur la modulation du comportement de stress du jeune mis dans des conditions stressantes telles que la séparation maternelle au moment du sevrage en présence de l'odorante, nous avons décidé d'étudier ces effets chez la souris.

# RESULTATS

## Chapitre I : Mise en place d'un modèle d'odorisation périnatale

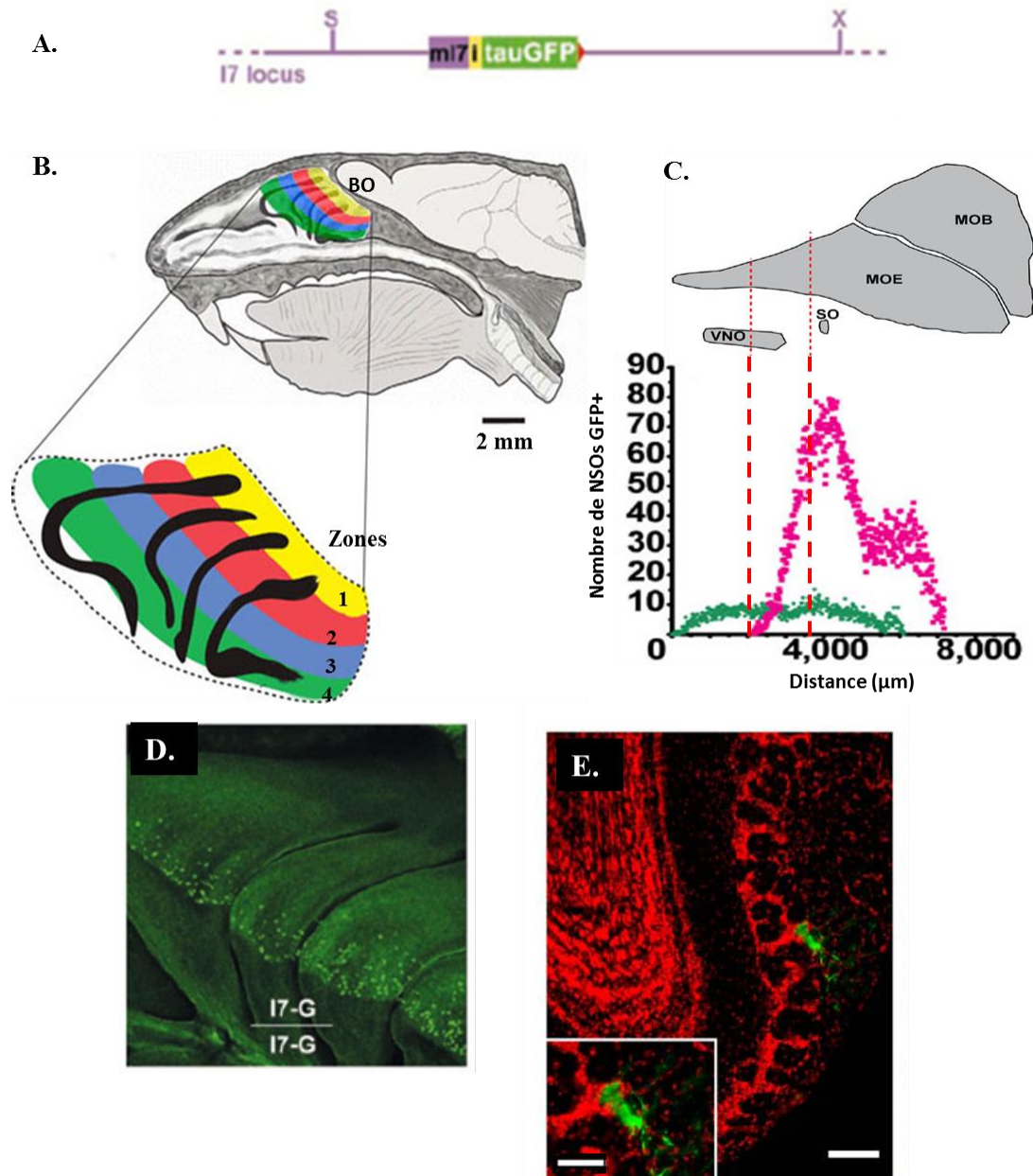
### I. Mise en place du design expérimental d'odorisation : modèle mI7-GFP

#### A. Choix de la lignée de souris transgénique : *mI7-IRES-tauGFP*

La première étape de ce travail de thèse a consisté à mettre en place un modèle d'odorisation périnatale chez la souris. Nous avons choisi d'utiliser la lignée de souris transgénique *mI7-IRES-tauGFP* car cette lignée était disponible au laboratoire et permettait un suivi des voies neuronales grâce au couplage de l'expression du récepteur mI7 (ou olfr2 selon la nomenclature) avec la Green Fluorescente protéine (GFP). De plus, peu d'études ont été menées sur cette lignée, par rapport aux autres lignées exprimant un RO couplé à la GFP ou lac Z comme M71 et M72 (Cf partie Introduction, chapitre 3).

Les souris transgéniques *mI7-IRES-tauGFP* ont été générées par l'équipe de T. Bozza (The Rockefeller University, New York) (Bozza et al, 2002) et nous ont été fournies par l'équipe de J. Reisert (Monell Chemical Senses Center, Philadelphia).

Les souris *mI7-IRES-tauGFP* obtenues ont un fond génétique mixé 129 x C57BL/6J et possèdent un génome où la séquence codant pour le récepteur I7 endogène est remplacée par une séquence *mI7-IRES-tauGFP* (**Figure 32 A.**). Les neurones olfactifs de ces souris exprimant le récepteur olfactif I7 de souris (mI7) expriment simultanément la GFP grâce à l'introduction d'un Internal ribosome entry site (IRES), ce qui permet de les repérer. Bozza et son équipe ont pu observer les NSOs marqués à la GFP, donc exprimant le récepteur mI7, au niveau des cornets de la MO, essentiellement dans la zone 3 de l'EO (**Figure 32 B. et D.**). Bressel et ses collaborateurs ont plus récemment montré une répartition hétérogène de ces NSOs dans l'axe antéro-postérieur de l'EO de souris adultes, avec un nombre plus important dans la partie centrale de cet axe de l'EO (**Figure 32 C.**) (Bressel et al, 2015).



**Figure 32 :** **A.** Diagramme représentatif des données liées à l'allèle *mI7-IRES-tauGFP* – les séquences *IRES-tauGFP* (boite verte) ont été introduites juste après la séquence codant pour le récepteur *mI7* (boite violette) au niveau du locus du récepteur *mI7* endogène (ligne violette) – **B.** Schéma d'organisation en 4 zones des NSOs dans l'EO chez la souris - adapté de Barber et Coppola, 2015 – **C.** Répartition des NSOs *mI7* (points roses) et des NSOs M71 (points verts) dans l'axe antéro-postérieur de l'EO obtenue après un comptage des neurones GFP+ à partir de coupes de MO imagées au microscope confocal – adapté de Bressel et al, 2015 - **D.** Vue médiane des cornets d'une souris *mI7-GFP* montrant les NSOs marqués à la GFP présents essentiellement dans la zone 3 de l'EO de la MO - adapté de Bozza et al, 2002 – **E.** Image d'une coupe coronale de BO d'une souris *mI7-GFP* – glomérule *mI7* (marquage vert) visible dans la partie antéro-ventro-latérale du BO – barre d'échelle 100  $\mu\text{m}$  et 50  $\mu\text{m}$  pour le zoom – adapté de Blanco-Hernandez et al, 2012.

Pour ce qui est des projections axonales des NSOs exprimant le récepteur mI7 au niveau des glomérules du BO, l'équipe de Blanco-Hernandez a observé la présence d'un glomérule en partie antéro-ventro-latéral de chaque BO (Blanco-Hernandez et al, 2012) (**Figure 32 E.**). Dans leur étude, Kerr et Belluscio ont quant à eux décrit les glomérules mI7 dans la partie ventrale du BO (Kerr et Belluscio, 2006). De par les observations que nous avons effectuées au laboratoire sur des blocs entiers de BO, nous avons pu localiser chez l'adulte 2 glomérules par bulbe, un ventral et l'autre médian dès le stade PND0 (données non présentées).

## **B. Choix du ligand odorant**

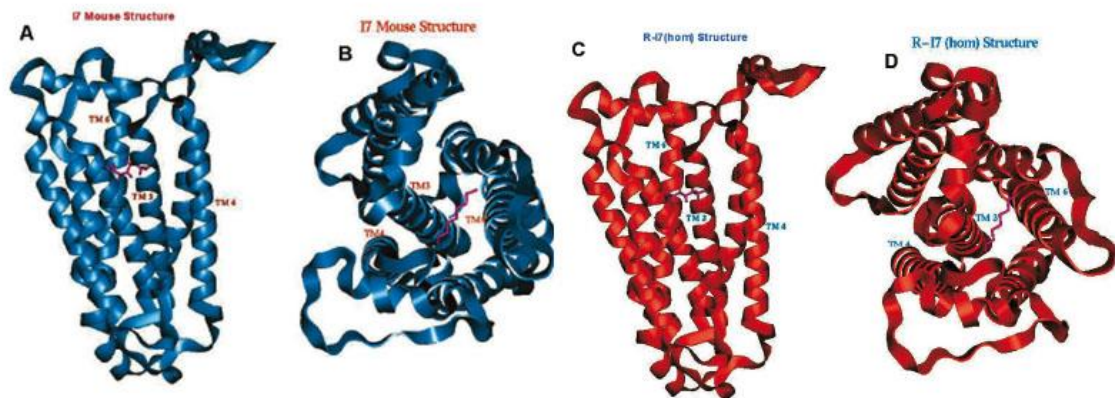
Le récepteur olfactif I7 a été relativement bien étudié sur le plan de sa structure, notamment chez le rat, un peu moins chez la souris. Sa modélisation tridimensionnelle a été réalisée chez ces 2 espèces (Hall et al, 2004) (**Figure 33**). La séquence en acides aminés présente 94% d'homologie entre eux (Krautwurst et al, 1998).

Ce récepteur fait partie des quelques ROs de mammifères à avoir été désorphanisés, c'est à dire avoir été associé à un ligand pour lequel il a de l'affinité.

Par mutagenèse dirigée, Krautwurst et ses collaborateurs ont montré que le récepteur I7 de souris (mI7) avait plus d'affinité pour l'heptanal que pour l'octanal et inversement pour le récepteur I7 de rat (rI7). Cette différence d'affinité serait due à la substitution d'une valine en isoleucine au niveau du site de liaison du ligand pour le récepteur de souris (Krautwurst et al, 1998). D'une manière plus générale, Araneda et ses collaborateurs ont montré en effectuant des électroolfactogrammes (EOG) sur de l'EO de rat que le récepteur I7 est spécifique des aldéhydes dont la composition en carbone est comprise entre 7 et 11 atomes (Araneda et al, 2004). D'autres études ont montré, grâce à l'utilisation de différentes techniques (expression du récepteur I7 en système hétérologue puis imagerie calcique, modélisation après construction tridimensionnelle (3D) du récepteur I7 et de ses ligands potentiels, EOG) que le récepteur I7 a une affinité plus prononcée pour l'octanal et / ou l'heptanal selon l'espèce, bien que la différence inter-espèces reste controversée (Araneda et al, 2000 et 2004 ; Bozza et al, 2002 ; Chen et al, 2008 ; Hall et al, 2004 ; Krautwurst et al, 1998 ; Reisert et al, 2010 ; Zhao et al, 1998). L'étude de Bozza et ses collaborateurs confirme la plus grande affinité de mI7 pour l'heptanal (Bozza et al, 2002).

Nous avons donc choisi l'heptanal comme ligand préférentiel du récepteur mI7 pour réaliser l'exposition odorante des souris au cours de cette étude. Cet odorant a déjà été utilisé

dans une étude pour procéder à l'odorisation de souris transgénique *mI7-GFP* / *M72-lacZ* (Valle-Leija et al, 2012).



**Figure 33** : Structure tridimensionnelle (3-D) du récepteur olfactif I7 – Sites de liaison prédits pour le ligand octanal pour le récepteur I7 souris : **A.** et **B.** et rat : **C.** et **D.** - Les figures **A.** et **C.** indiquent la profondeur de la poche de fixation à environ  $\sim 10$  Å de la surface extracellulaire pour les récepteurs I7 **A.** : de souris et **C.** : de rat - la poche de liaison au ligand est située entre les hélices transmembranaires 3, 4 et 6 - Les résidus entrant en contact direct avec l'odorant sont dans la région hypervariable identifiée lors de l'alignement des séquences de ces 2 récepteurs – adapté de Hall et al, 2004.

### C. Choix de la fenêtre temporelle d'exposition odorante

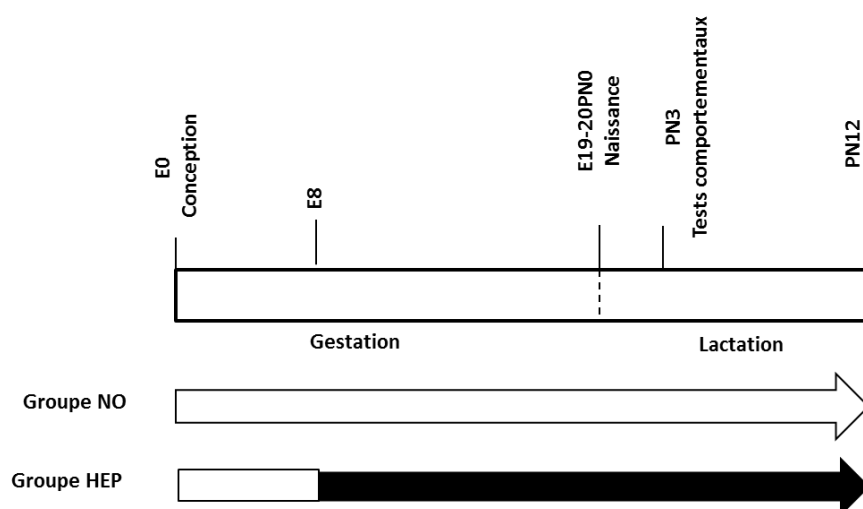
Pour s'assurer que l'exposition odorante est effective au moment des événements majeurs du développement du système olfactif, entre les stades embryonnaires 10 jours (E10) et E12 pour le développement des premiers NSO et glomérules (cf introduction), nous avons décidé de la débiter à E8, c'est à dire 8 jours après l'observation du bouchon vaginal à E0.

Concernant la fenêtre d'exposition de la lignée de souris transgénique *mI7-IRES-GFP*, pour laquelle les glomérules I7 sont en place dès la naissance et se poursuit pendant la période postnatale (Valle-Leija et al, 2012), le choix d'une période d'exposition odorante continue pendant la gestation et au cours de la lactation nous a semblé pertinente. De plus, une seule étude a cumulé les deux fenêtres temporelles d'exposition odorante pré- et post-natale pour évaluer les effets comportementaux sur les descendants des lignées M71 et M72 (Todrank et al, 2011). En cumulant ces deux périodes, nous pensions que cela pouvait amplifier les effets qui ont déjà été observés lors d'une exposition uniquement pendant la gestation. Nous avons donc choisi une exposition odorante continue entre E8 et PN21 (**Figure 34**).

## D. Choix des stades de développement étudiés

Deux stades ont été particulièrement ciblés (**Figure 34**). Pour les études comportementales de préférence olfactives liées aux effets de l'exposition odorante, nous avons décidé de nous placer à 3 jours après la naissance (PN3), âge précoce où les souriceaux sont peu mobiles et leurs yeux sont clos, ils sont donc relativement dépendants de leur sens olfactif. Cette période correspond à la mise en place de la lactation, cruciale pour la survie du nouveau-né.

Pour les études physiologiques (EOG), nous avons décidé de nous placer à un âge plus avancé, PN12, pour évaluer les effets de l'exposition odorante à plus long terme sur la sensibilité de la muqueuse olfactive, mais également pour des raisons pratiques liées à la petite taille des tissus par rapport aux électrodes, donc non enregistrables avant cet âge.



**Figure 34** : Plan d'odorisation et d'expériences effectuées sur les souriceaux issus des 2 groupes – la partie pleine des flèches indique la période pendant laquelle les mères ont consommé des croquettes odorisées à l'heptanal 10% - modèle de souris *mI7-GFP*.

## E. Choix des conditions d'odorisation des croquettes

Afin d'odoriser l'alimentation maternelle, nous nous sommes appuyés sur les données de la littérature montrant que les odorisations via l'alimentation sont généralement conduites avec des concentrations variables, mais importantes d'odorant (pur ou 10% comme la vanilline, le 4-ethylguaiacol (odeur fumée), l'odeur de fromage, l'anis, l'acetophenone, l'isopropyl tiglate (odeur de cerise) (Becques et al, 2009 ; Hepper et al, 2012 ; Oostindjer et al, 2011 ; Todrank et al, 2011 ; Hepper et Wells, 2006). Jusqu'à présent, aucune étude n'a

utilisé l'heptanal dans l'alimentation pour odoriser les animaux. Seuls Valle-Leija et collaborateurs ont utilisé cet odorant pour odoriser l'environnement des souris à 0,1, 1 et 10% et ont observé des effets dose-dépendants (Valle-Leija et al, 2012). Nous avons donc choisi de travailler à une concentration d'heptanal 10% pour odoriser la nourriture maternelle.

## II. Données métaboliques

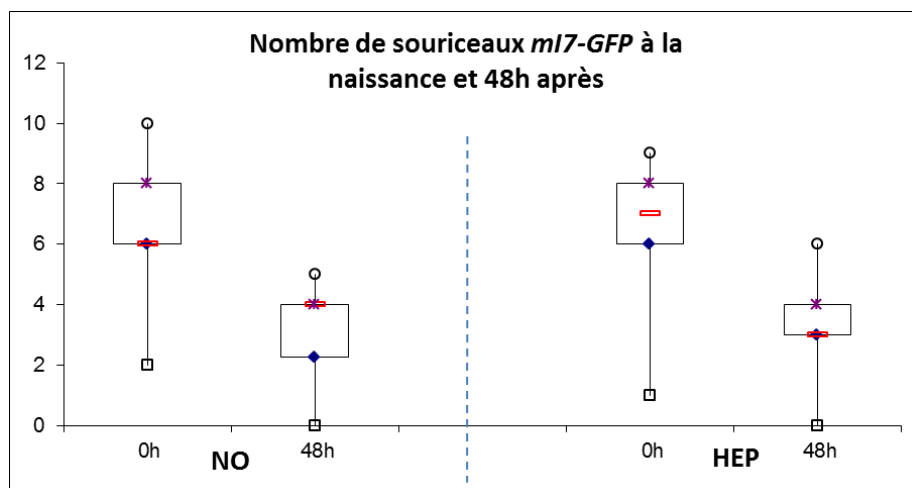
### A. Conditions d'élevage souris

Les souris sont hébergées dans l'animalerie centrale située sur le centre (Unité Expérimentale d'Infectiologie Expérimentale des Rongeurs et des Poissons (UEIERP) ; Jouy-en-Josas ; France). Elles sont maintenues dans des conditions standardisées d'élevage, à une température contrôlée de 22°C, avec des cycles lumineux alternés de 12 heures (off 19h) et avec un accès libre au biberon et à la nourriture normale (M25; Dietex, Saint-Gratien, France) jusqu'à leur mise en expérimentation. Après sevrage, les mâles et femelles sont élevés en cage individuelle. Pour éviter les problèmes rencontrés avec les femelles primipares (pourcentage de mortalité des souriceaux très important), les femelles utilisées dans les phases d'odorisation sont accouplées dès l'âge de 8 semaines afin qu'elles produisent une première portée. Dès le sevrage de leur première portée, les femelles sont utilisées comme reproductrices expérimentales.

Les accouplements sont effectués sur la nuit. Les femelles possédant un bouchon vaginal sont considérées comme gestantes, isolées, pesées les jours suivants pour confirmer si elles sont bien gestantes. Elles sont séparées à 8 jours de gestation (E8) en 2 groupes, dans deux cellules différentes. Un groupe reçoit alors des croquettes contrôles (groupe NO) et l'autre groupe des croquettes odorisées (groupe HEP). Les croquettes sont préparées la veille de leur distribution. Pour le groupe contrôle (NO), des croquettes standards (M25 - Dietex) sont imprégnées (10 ml pour 125 g de croquettes) avec de l'éthanol 90%. Pour le groupe odorisé (HEP), les mêmes croquettes sont imprégnées avec une solution d'heptanal à 10% dilué dans de l'éthanol, l'heptanal n'étant pas miscible dans l'eau (10 ml pour 125 g de croquettes). Les 2 lots de croquettes sont préparés puis laissés dans des cristallisoirs sous deux sorbonnes différentes pendant une nuit afin de permettre l'évaporation de l'éthanol, avant d'être utilisées comme nourriture expérimentale. Les animaux sont nourris *ad libitum* avec ces croquettes. Tous les lundis, mercredis, vendredis, les croquettes sont changées afin que le niveau d'odorisation reste relativement homogène, tout en n'étant techniquement pas trop lourd à mettre en place.

## B. Effet de l'odorisation sur les paramètres d'élevage des souris *mI7-GFP*

Afin de s'assurer que les conditions d'obtention et d'élevage des souriceaux *mI7-GFP* n'étaient pas perturbées par les conditions expérimentales, nous avons effectué un comptage des souriceaux *mI7-GFP* à la naissance, puis 48h après la naissance. 26 portées ont été étudiées pour le groupe NO et 25 portées pour le groupe HEP. Les résultats obtenus sont présentés en **Figure 35**.



**Figure 35** : Diagramme en boxplots représentant le nombre de souriceaux *mI7-GFP* à la naissance et 48h après pour 26 portées du groupe NO et 25 portées du groupe HEP.

A la naissance, le nombre moyen de souriceaux/portée est compris entre 2 et 10 souriceaux pour le groupe NO et 1 et 9 souriceaux pour le groupe HEP, avec respectivement des médianes de 6 et 7 souriceaux/portée. Après 48h, ces valeurs chutent, avec des portées comprises entre 0 et 5 souriceaux pour le groupe NO et 0 et 6 souriceaux pour le groupe HEP, avec respectivement des médianes de 4 et de 3 souriceaux. Les pourcentages moyens de survie des souriceaux dans les 48h après la naissance sont 53% pour le groupe NO et 49% pour le groupe HEP. L'analyse statistique ne révèle pas d'effet de l'exposition odorante sur ces mesures (test non paramétrique par permutation).

Dans les 48h suivant la naissance, nous observons une perte d'environ 50% des souriceaux. La mortalité périnatale est forte, ce qui veut dire que le nombre de souriceaux disponibles dans chaque portée pour effectuer les tests et analyses est très limité, très variable selon la portée, et peu acceptable sur le plan éthique. Cependant, ce faible pourcentage de survie n'est pas corrélé à l'exposition à l'heptanal.



### C. Effet de l'odorisation sur la consommation journalière maternelle en nourriture NO et HEP

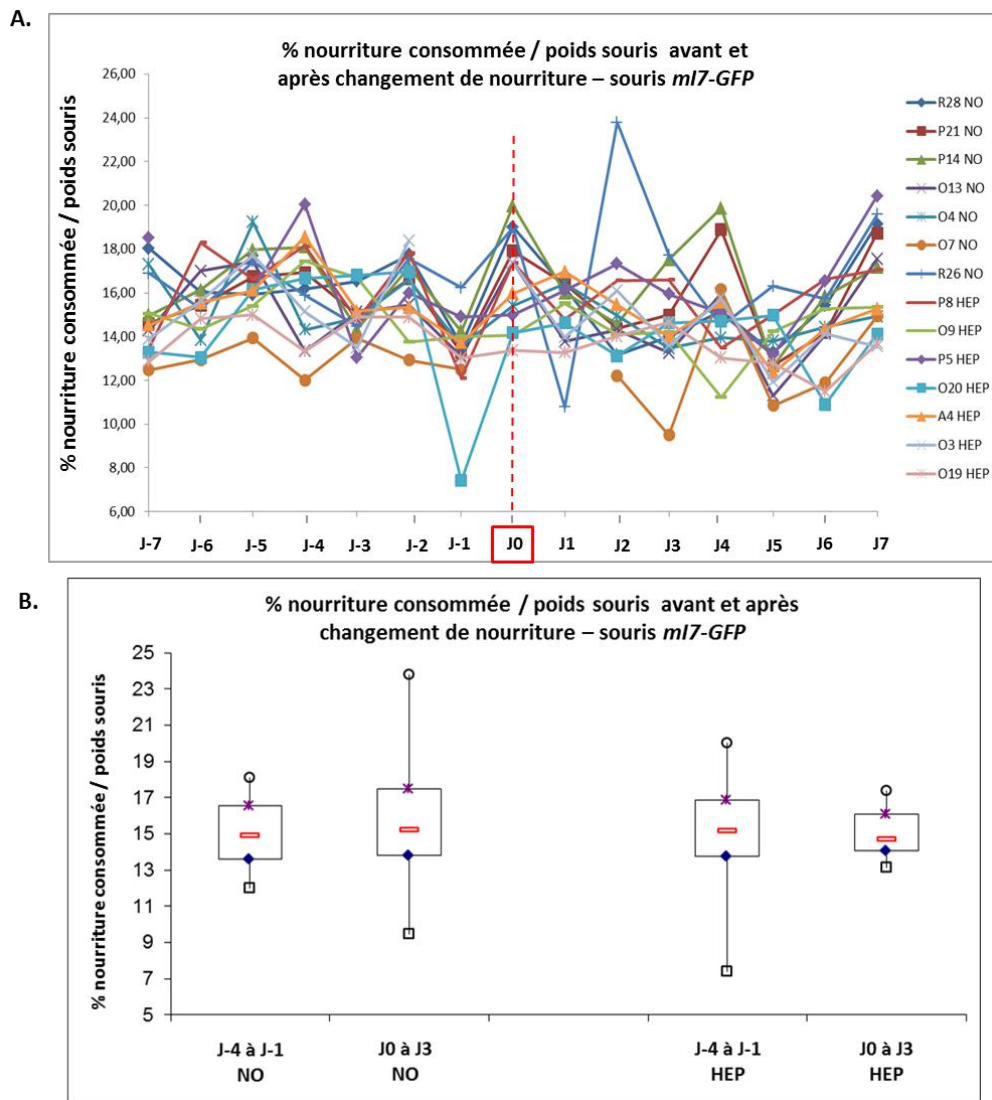
Comme nous l'avons mentionné ci-dessus, à E8, les femelles gestantes subissent un changement environnemental brusque lié à :

- un changement de cellule,
- un changement de croquettes (croquettes NO ou HEP).

De tels changements pourraient engendrer des perturbations de leur comportement alimentaire. Nous avons vérifié que ces changements n'induisaient pas d'effets au niveau de la consommation alimentaire journalière.

Pour cela nous avons pesé quotidiennement des femelles *mI7-GFP* et leur nourriture (7 femelles NO et 7 femelles HEP) pendant les 7 jours précédents et les 7 jours suivant le changement de nourriture. Nous avons choisi d'effectuer ces mesures sur des femelles non gestantes pour ne pas avoir de biais apportés avec les variations de consommation de nourriture pendant la gestation, liées à la taille de la future portée. Nous avons mesuré les variations de consommation en nourriture inter individus (**Figure 36 A.**). Puis, nous avons calculé le pourcentage moyen de nourriture consommée par rapport au poids de la souris pendant les 4 jours précédant et les 4 jours suivant le changement de nourriture pour les 2 groupes NO et HEP. Les résultats sont donnés en **Figure 36 B.**

Si nous nous intéressons aux courbes de consommation individuelle (**Figure 36 A.**), nous observons de grandes variations inter individus et inter jours, pour les périodes entre J-7 et J-1 (avant changement de croquettes – souris nourries avec des croquettes standards) et entre J0 et J7 (après changement de croquettes – souris nourries avec des croquettes NO ou HEP). Le pourcentage moyen de nourriture consommé quotidiennement est de 15,4 % du poids vif pour le groupe NO et 15,3% pour le groupe HEP les 7 jours avant le changement de croquettes, et de 15,5% pour le groupe NO et 15% pour le groupe HEP les 7 jours après le changement. Sur ces 2 périodes (avant et après changement), les souris varient dans leur consommation en nourriture journalière et nous pouvons également observer des différences entre les souris. Néanmoins, les variations de consommation observées sont indépendantes du type de croquettes consommées (NO ou HEP).



**Figure 36 :** Evolution du pourcentage de nourriture consommée par rapport au poids de la souris en fonction des conditions expérimentales – Souris *mI7-GFP* non gestantes – avant et après changement de croquettes (J0) – **A.** Courbes individuelles du pourcentage de nourriture consommé rapporté au poids des souris des 2 groupes NO et HEP les 7 jours avant et les 7 jours après changement de croquettes – **B.** Graphique en box-plots montrant les pourcentages de nourriture consommée rapportés au poids des souris les 4 jours précédents et les 4 jours suivant le changement de nourriture et de cellule – groupe NO (n=7) et groupe HEP (n= 7) (test non paramétrique par permutation).

Si nous nous intéressons maintenant aux consommations moyennes en nourriture les 4 jours avant et les 4 jours après changement de croquettes (**Figure 36 B.**), nous n’obtenons pas de différence significative ni pour le groupe des NO ni pour le groupe des HEP (médiane des pourcentages moyens par jour : 14,9% pour le groupe NO et 15,1% pour le groupe HEP avant changement de croquettes et 15,2% pour le groupe NO et 14,7% pour le groupe HEP après changement - test non paramétrique par permutation).

Le changement de nourriture et de cellule ne semble donc pas modifier durablement la prise alimentaire des souris *mI7-GFP*, NO ou HEP, et n'induit donc pas de stress à la consommation au changement d'alimentation. Les souris des 2 groupes NO et HEP ont des consommations équivalentes en croquettes, même après le changement. Bien que nous ne l'ayons pas testé, nous faisons l'hypothèse ici que c'est également le cas des femelles en gestation de notre étude.

#### **D. Recherche de la présence d'heptanal dans le liquide amniotique et le lait des souris *mI7-GFP***

##### **1) Protocole expérimental**

###### **a) GC-MS/MS**

Afin de s'assurer de la présence de l'heptanal dans le liquide amniotique (LA) et le lait des souris *mI7-GFP*, suite à une exposition odorante avec de l'heptanal à 10% via l'alimentation de la mère, nous avons choisi d'effectuer des prélèvements de liquides maternels biologiques et utilisé la technique de chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS/MS) (Ingrand, 2012). Nous avons choisi cette technique car elle est 10 fois plus sensible que la technique de GC-MS seule, permettant de faire ressortir plus aisément du bruit de fond un composé présent en faible quantité.

Cette technique comporte 3 étapes : une première étape de chromatographie en phase gazeuse (GC) permet la séparation des différentes molécules chargées (ions) d'un échantillon en fonction de leur affinité pour la phase stationnaire, qui provoque un phénomène de rétention chromatographique avec les différents ions. Plus l'ion a d'affinité avec la phase stationnaire, plus il mettra de temps à sortir de la colonne et plus son temps de rétention sera élevé. Les composés volatils présents dans l'échantillon testé se fixent sur la fibre HS-SPME (Headspace (HS) et micro-extraction en phase solide (SPME)) de l'appareil après avoir été chauffés (Papet et al, 2010). Ils vont ensuite passer dans une chambre d'ionisation, puis par l'intermédiaire d'un flux d'hélium, ces composés ionisés vont alors traverser la colonne de GC et être séparés. Une deuxième étape de spectrométrie de masse (MS) permet la détection et l'identification des ions en fonction de leur rapport masse / charge. Suite à cette deuxième étape, une sélection d'un ion caractéristique du composé à analyser va être effectuée. Puis une troisième étape de spectrométrie de masse (MS) va consister à provoquer la fragmentation par de l'argon de l'ion caractéristique sélectionné, puis analyser la masse des fragments obtenus, ce qui permet d'être plus précis et plus sensible. Nous avons sélectionné l'ion majoritaire le

plus représentatif de l'heptanal. Cet ion va être fractionné en trois ions grâce à l'utilisation d'Argon.

### **b) Prélèvements de liquide amniotique**

Nous avons choisi d'effectuer les prélèvements de liquide amniotique à 14 jours de gestation (E14), soit 6 jours après la mise en place de l'odorisation, car à cet âge embryonnaire, la quantité de liquide amniotique présente dans chaque poche reste suffisante pour pouvoir être prélevée.

Les femelles ont été sacrifiées par dislocation cervicale. Une ouverture a ensuite été effectuée avec des ciseaux chirurgicaux au niveau de l'abdomen. Puis les fœtus entourés de leur poche amniotique ont été extraits de l'abdomen de la mère. Les liquides amniotiques ont été immédiatement prélevés un à un, à partir de chaque poche amniotique qui entoure chaque fœtus à l'aide d'une pipette en verre très fine, puis transférés dans des tubes en verre (les différents liquides amniotiques pour une même femelle sont poolés dans le même tube), dans la glace, puis conservés à -20°C jusqu'à leur analyse.

### **c) Prélèvements de laits**

Pour les prélèvements de lait, les femelles à PN3 et PN12 ont été séparées de leurs sourceaux pendant 4h afin d'optimiser la quantité de lait à prélever. Elles ont ensuite reçu une injection d'ocytocine (100U/kg) afin d'accélérer la production de lait, puis ont été anesthésiées 30 min après avec une injection de ketamine-HCl et xylazine (100 mg/kg et 10 mg/kg, respectivement). Après avoir vérifié l'efficacité de l'anesthésie par un pincement de la queue, nous avons effectué un massage manuel de chaque mamelon de la souris afin de permettre l'excrétion du lait. Le lait excrété a alors été prélevé par capillarité dans une pipette pasteur, puis transféré dans un tube en verre dans la glace, puis conservé à -20°C jusqu'à analyse.

## **2) Résultats**

### **a) Etalonnage de l'appareil pour le composé recherché**

Afin de mettre au point la technique de GC-MS/MS pour la recherche d'heptanal, nous avons effectué une analyse préliminaire en déposant un petit volume (1µl) d'heptanal pur sur la colonne. Après fragmentation à l'Argon de l'ion majoritaire sélectionné pour l'heptanal,

nous avons obtenu 3 pics correspondants aux 3 ions résultants du fractionnement, dont les temps de rétention sont compris entre 7,95 et 7,97 (**Figure 37 A.**).

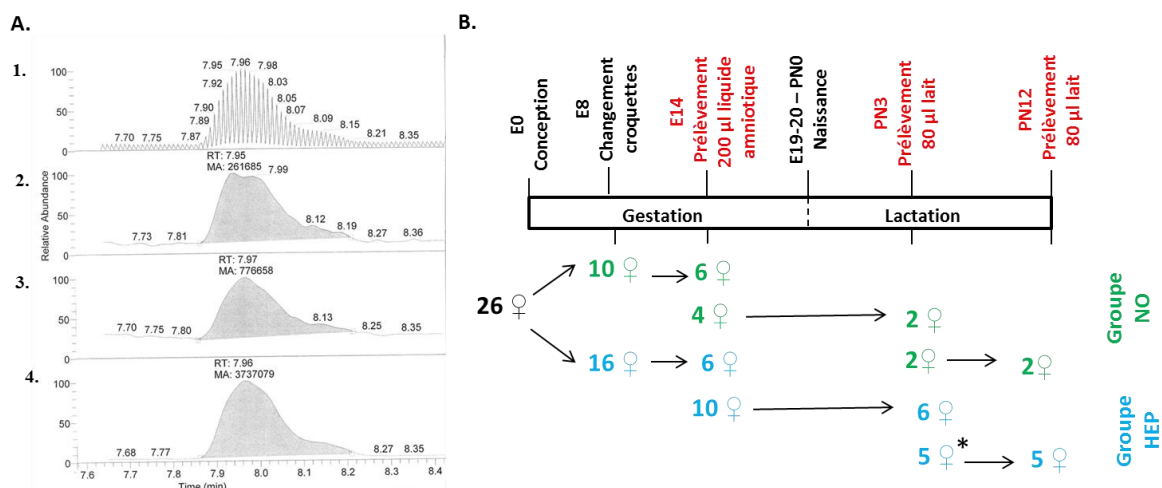
Nous avons ensuite effectué cette même analyse sur du liquide amniotique et du lait issus de souris *mI7-GFP* non odorisées afin de nous assurer que ces matrices ne contenaient pas d'heptanal.

Puis nous avons dilué de l'heptanal pur dans du liquide amniotique ou du lait de souris *mI7-GFP* afin de nous assurer que ces matrices ne pouvaient pas interférer dans la détection de l'heptanal. Nous avons retrouvé les 3 pics correspondants aux 3 ions majoritaires caractéristiques de l'heptanal dans ces échantillons montrant ainsi l'absence d'interférence de la matrice et la possibilité de mettre en évidence la présence de l'heptanal dans ces fluides biologiques avec cette technique (données non présentées).

#### **b) Recherche de l'heptanal dans les fluides biologiques prélevés**

26 femelles *mI7-GFP* ont été mises en accouplement comme décrit ci-dessus (**Figure 37 B.**). A 8 jours de gestation (E8), les femelles gestantes ont été séparées en 2 groupes : 10 d'entre elles sont passées sous un régime contrôle avec des croquettes NO et les 16 autres sous un régime « odorisé » avec des croquettes HEP. A 14 jours de gestation (E14), 6 femelles de chaque groupe ont été sacrifiées et environ 200 µl de liquide amniotique ont été prélevés à partir de chaque femelle. Les autres femelles ont été laissées jusqu'à la mise-bas. A PN3, 2 femelles du groupe NO et 6 femelles du groupe HEP ont été prélevées, et à PN12, 2 femelles du groupe NO et 5 femelles du groupe HEP ont été prélevées. Pour les prélèvements de lait, environ 80 µl par femelle ont été prélevés. Ces volumes ont été choisis sur la base de la quantité moyenne de liquide prélevé par souris. (**Figure 37 B.**).

Les différents prélèvements ont été déposés sur la colonne de GC-MS et analysés comme indiqué ci-dessus pour l'étalonnage. Nous avons calculé l'aire sous pic pour chacun des 3 pics et nous avons ensuite fait la somme de ces 3 aires pour chaque animal. Cette somme est représentative de la quantité d'heptanal présente dans le fluide (**Figure 38 A. à C.**). Nous constatons que pour les fluides issus de mères NO, les valeurs d'aires sous pics ne sont pas nulles. Mais ces valeurs sont, entre elles, du même ordre et bien inférieures à celles obtenues pour les fluides HEP (4 à 5 fois plus faibles pour les LA et les laits PN3 et 28 fois plus faible pour les laits PN12).



**Figure 37** : Résultats obtenus en GC-MS/MS lors des mises au point du protocole pour la détection de l'heptanal dans les fluides biologiques et plan d'odorisation et de prélèvements des souris *mI7-GFP* – **A**. Pics obtenus pour l'analyse d'1µl d'heptanal pur – **A1**. Ensemble des pics obtenus après fragmentation à l'Argon des ions obtenus pour l'heptanal – **A2**. à **A4**. Fragmentation de l'ion majoritaire sélectionné pour l'heptanal en 3 ions – temps de rétention pour ces 3 ions entre 7,95 et 7.97 – **B**. Planning d'odorisation et de prélèvements de liquides amniotiques et laits PN3 et PN12 effectués sur les souris *mI7-GFP* issus des 2 groupes – prélèvements de liquide amniotique à E14 – volume ~ 200 µl et prélèvements de laits à PN3 et PN12 – volume ~ 80 µl - \* : parmi les 6 femelles prélevées à PN3, 1 a été prélevée une seconde fois à PN12 (femelle M2).

Avec les valeurs des sommes d'aires sous pics obtenues, nous avons calculé pour chaque échantillon issu d'une femelle HEP le rapport aire sous pic de l'échantillon divisé par l'aire sous pic moyen obtenu avec le groupe des femelles NO pour un même fluide biologique. Nous avons considéré qu'un rapport supérieur ou égal à 2,5 validait la présence d'heptanal dans l'échantillon.

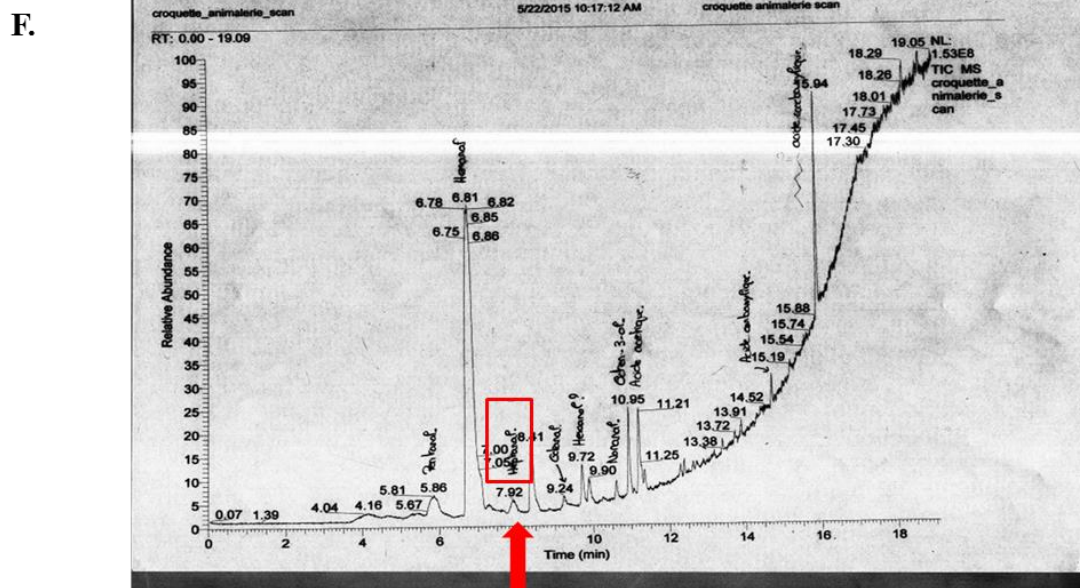
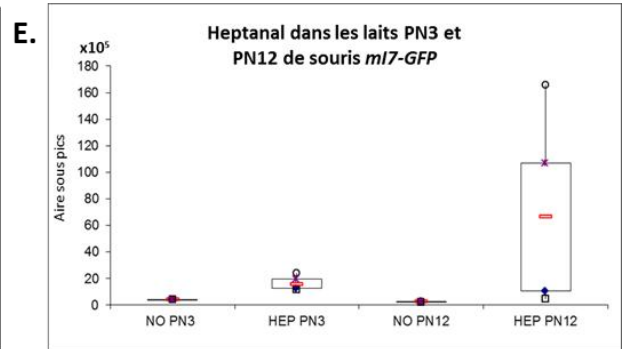
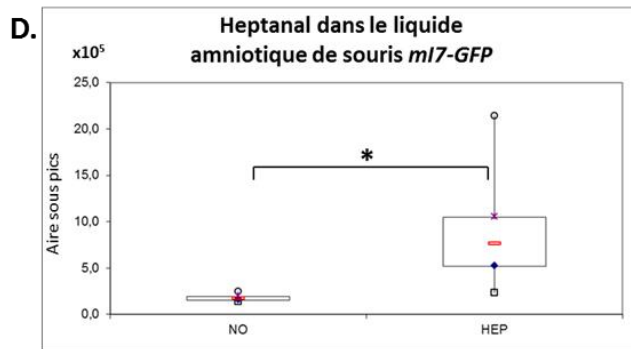
Nous avons ainsi pu confirmer la présence d'heptanal au-delà du seuil technique dans 5 échantillons de LA de souris *mI7-GFP* HEP sur les 6 prélevés ainsi que dans l'ensemble des 6 laits PN3 et 5 laits PN12 de souris *mI7-GFP* HEP prélevés (**Figure 38 A., B. et C.**). L'analyse statistique des données atteste de la présence d'heptanal dans les LA issus de femelles HEP comparés à ceux des femelles NO (test non paramétrique par permutation –  $p=0.0328$ ) (**Figure 38 C.**). Nous n'avons pas pu effectuer d'analyse statistique pour comparer les valeurs obtenus pour les laits issus de mères NO et HEP à PN3 et PN12 car le nombre d'échantillons de laits PN3 et PN12 NO testés n'est pas suffisant (égal à 2). De plus, nous avons pu mettre en évidence une grande disparité dans les valeurs obtenues pour les laits

PN12 HEP, traduisant des différences importantes inter individus dans la quantité d'heptanal dans les laits PN12.

Enfin, compte tenu du fait que nous n'ayons pas obtenu de valeurs nulles pour les fluides issus des femelles non odorisées, nous avons analysé par la technique de GC-MS seule des croquettes de base et des croquettes HEP afin de vérifier que les croquettes de base ne contiennent pas d'heptanal. De façon surprenante, nous avons retrouvé de l'heptanal en faible quantité dans les croquettes de base, comme le montre le chromatogramme des pics que nous avons obtenu pour cette croquette. En effet, pour la croquette de base, un pic correspondant à l'heptanal a été retrouvé à un temps de rétention de 7,92 (**Figure 38 F.**). Cependant, comparativement au chromatogramme de pics obtenus avec la croquette HEP (données non présentées), nous avons mesuré avec le calcul de l'aire sous pic correspondant à l'heptanal, que la quantité d'heptanal présente dans les croquettes de base est 1300 fois moins importante que dans les croquettes HEP, elle peut donc être considérée comme négligeable comparativement à la quantité présente dans les croquettes HEP, mais pourrait en partie expliquer le fait que les valeurs d'aires sous pics obtenues pour les fluides issus de femelles non odorisées ne soient pas nulles.

Conclusion : Par la technique de GC-MS/MS, nous avons validé la présence d'heptanal dans le liquide amniotique et le lait des souris *mI7-GFP* ayant consommé des croquettes odorisées à l'heptanal 10% en comparaison des souris témoins. Nous avons donc démontré le passage de ce composé odorant dans les fluides biologiques maternels, bien que des différences importantes entre animaux soient observées. Les souriceaux *mI7-GFP* issus de ces mères sont exposés à l'heptanal *in utero* via le liquide amniotique et *ex utero* via le lait maternel. De plus, même si les valeurs de l'odorant dans les liquides biologiques contrôle ne sont pas nulles, elles peuvent être considérées comme négligeables.

A.			B.			C.		
Liquide amniotique Souris <i>mI7-GFP</i>	Aires sous pics	Rapports HEP / moy NO	Lait PN3 Souris <i>mI7-GFP</i>	Aires sous pics	Rapports HEP / moy NO	Lait PN12 Souris <i>mI7-GFP</i>	Aires sous pics	Rapports HEP / moy NO
♀ M6 HEP	2144237	12,0	♀ M2 HEP	1135117	2,8	♀ M2 HEP	1072586	4,2
♀ J7 HEP	913403	5,1	♀ O20 HEP	2398150	6,0	♀ P12 HEP	8614690	33,6
♀ D2 HEP	617792	3,5	♀ P21 HEP	2067947	5,2	♀ O4 HEP	16561047	64,6
♀ B9 HEP	230964	1,3	♀ L2 HEP	1207753	3,0	♀ O8 HEP	10709264	41,7
♀ A6 HEP	483864	2,7	♀ O10 HEP	1672934	4,2	♀ N4 HEP	2852322	11,1
♀ Q8 HEP	1090462	6,1	♀ P5 HEP	1391061	3,5	♀ O18 NO	281997	
♀ A3 NO	195152		♀ M13 NO	409483		♀ Q7 NO	231032	
♀ A13 NO	178999		♀ M14 NO	390626		moyenne lait mi7 NO	256515	
♀ O11 NO	147254		moyenne lait mi7 NO	400055				
♀ B33 NO	245159							
♀ D6 NO	168673							
♀ B19 NO	137092							
moyenne NO	178722							



**Figure 38** : Recherche d'heptanal dans les fluides biologiques des souris *mI7-GFP* par la technique de GC-MS/MS – **A.** à **C.** : Tableaux récapitulatifs des valeurs d'aires sous pics et des rapports dans le liquide amniotique et les laits des souris *mI7-GFP* odorisées (HEP) ou non (NO) - **A.** liquides amniotiques, **B.** laits PN3, **C.** laits PN12 – **D.** et **E.** : Diagrammes en box-plot récapitulatif des valeurs d'aires sous pics et des rapports des souris NO ou HEP - **D.** dans les liquides amniotiques, **E.** et les laits (test non paramétrique par permutation) - **F.** Chromatogramme de l'ensemble des composés volatiles présents dans une croquette M25 en GC-MS.



## **E. Effets d'une exposition périnatale à l'heptanal sur le comportement olfactif des souriceaux à PN3**

Les effets d'une exposition périnatale à l'heptanal via l'alimentation de la mère sur le comportement olfactif des souriceaux ont été testés à l'aide d'un test comportemental inspiré d'Al Aïn (Al Aïn et al, 2013). Ce test, basé sur le réflexe de tétée chez le nouveau-né à PN0 et à PN1, consiste à approcher un jeune animal du flanc d'une mère anesthésiée et de mesurer la latence des souriceaux à attraper la mamelle. Nous avons choisi ce test, car il permet de tester si les souriceaux initieront la tétée uniquement sur une mamelle imprégnée des clés olfactives qui leur sont familières, car rencontrées *in utero*. Nous avons choisi d'effectuer ce test à PN3, période proche de la mise en place de la lactation. A cet âge, les souriceaux sont peu mobiles et leurs yeux sont clos, ils sont donc relativement dépendants de leur sens olfactif.

### **1) Protocole expérimental**

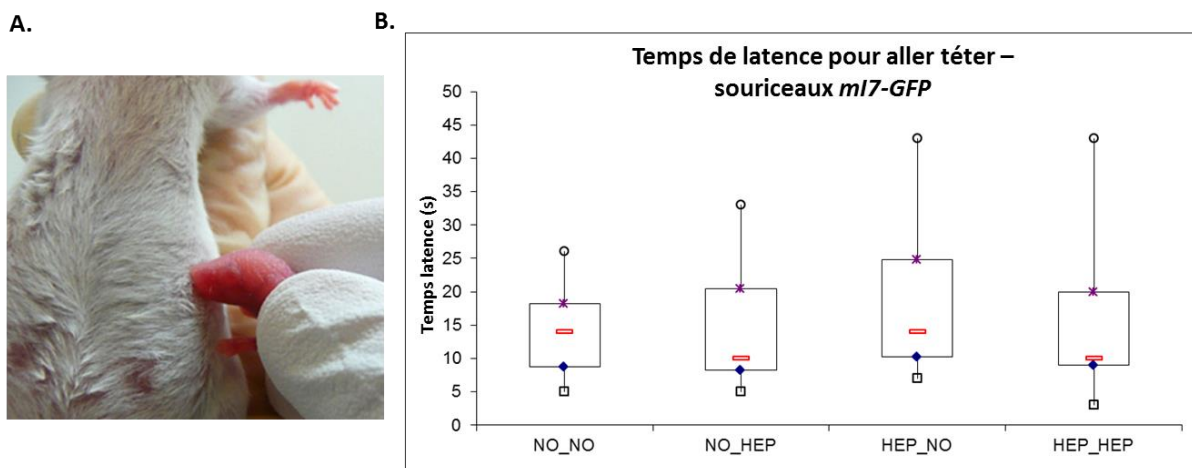
Les souriceaux de 3 jours sont séparés de leur mère entre 45 min et 1h30 avant le test, en isolant la portée dans une cage avec de la sciure propre pour éviter tout contact avec des odeurs maternelles, sous lampe rouge chauffante et dans une cellule différente de celle des mères pour éviter toute communication entre les souriceaux et leur mère par vocalises. En parallèle, 2 mères, une mère contrôle NO et une mère odorisée HEP non familières aux individus testés, sont anesthésiées avec une injection de ketamine-HCl et xylazine (100 mg/kg et 10 mg/kg, respectivement). Elles sont disposées en position dorsale sur un coussin chauffé à 37°C. Les souriceaux des lots expérimentaux sont récupérés individuellement et tenus délicatement entre le pouce et l'index positionnés au niveau des flancs, sous l'épaule et sont approchés un par un à moins d'un centimètre de la mamelle d'une mère NO ou d'une mère HEP pendant 45 secondes (**Figure 39 A.**). La latence d'accrochage à la mamelle est notée. Si le souriceau n'a pas tété, il lui est attribué un score de 45s. Chaque animal n'est testé qu'une seule fois.

### **2) Résultats**

6 séries d'expériences indépendantes ont été conduites. 25 souriceaux NO issus de 10 portées (NO\_NO) et 33 souriceaux HEP issus de 13 portées (HEP\_NO) ont été testés sur une mère non familière NO ; 30 souriceaux NO issus de 14 portées (NO\_HEP) et 27 souriceaux HEP issus de 10 portées (HEP\_HEP) ont été présentés à une mère non familière HEP.

Le nombre de souriceaux par portée était ici relativement faible, allant de 2 à 5 souriceaux pour le groupe NO et 1 à 7 souriceaux pour le groupe HEP et en moyenne 4 souriceaux pour les deux groupes, ce qui est à rapprocher des valeurs obtenues lors des mesures de survie des souriceaux *mI7-GFP* (Cf partie II 2) de ce chapitre). L'effet « portée » n'a pu être analysé compte-tenu du faible nombre de souriceaux par portée. De plus, 31% des souriceaux NO et 36% des souriceaux HEP n'ont pas tété pendant le test.

Pour analyser les résultats obtenus, nous avons retiré ces souriceaux des calculs effectués et nous avons comparé les temps de latence entre les 4 groupes (**Figure 39 B.**). Les résultats montrent qu'il n'y a pas de différence significative entre les 4 groupes (n=16 NO\_NO, n=22 NO\_HEP, n=22 HEP\_NO et n=13 HEP\_HEP, test Asymptotic Kruskal-Wallis). Ceci est à relier à une variabilité importante inter groupe, particulièrement pour les groupes HEP.



**Figure 39** : Test de réflexe de tétée à la mamelle à PN3 - temps de latence pour aller téter – **A.** illustration du test - le souriceau, tenu entre le pouce et l'index du manipulateur est présenté à 1 cm de la mamelle d'une mère anesthésiée – le temps de latence pour aller téter est alors enregistré – photo adaptée de [Al Ain et al, 2013](#) – **B.** Graphique en box-plot illustrant les temps de latence pour aller téter pour les 4 groupes – NO\_NO (n=16) : souriceau NO soumis au test sur une mère NO, NO\_HEP (n=22) : souriceau NO soumis au test sur une mère HEP, HEP\_NO (n=22): souriceau HEP soumis au test sur une mère NO et HEP\_HEP (n=13) : souriceau HEP soumis au test sur une mère HEP (test Asymptotic Kruskal-Wallis).

Ce test réalisé à PN3 ne nous a donc pas permis de conclure à un effet des conditions d'odorisation périnatale sur le temps de latence à trouver la tétine des souriceaux *mI7-GFP* à PN3, contrairement à ce qui avait été observé par Al Ain et ses collaborateurs qui avaient utilisé ce test afin de déterminer quels fluides biologiques maternels pouvaient éliciter la tétée chez des souriceaux à PN0 et PN1. Le nombre de souriceaux n'ayant pas tété pendant le test

est anormalement élevé compte tenu du fait que la séparation maternelle préalable au test aurait dû engendrer un regain d'activité et de motivation pour aller téter.

## **F. Effet d'une exposition odorante périnatale sur la réponse de la MO à des stimulations à l'heptanal – ElectroOlfactoGramme (EOG) à PN12**

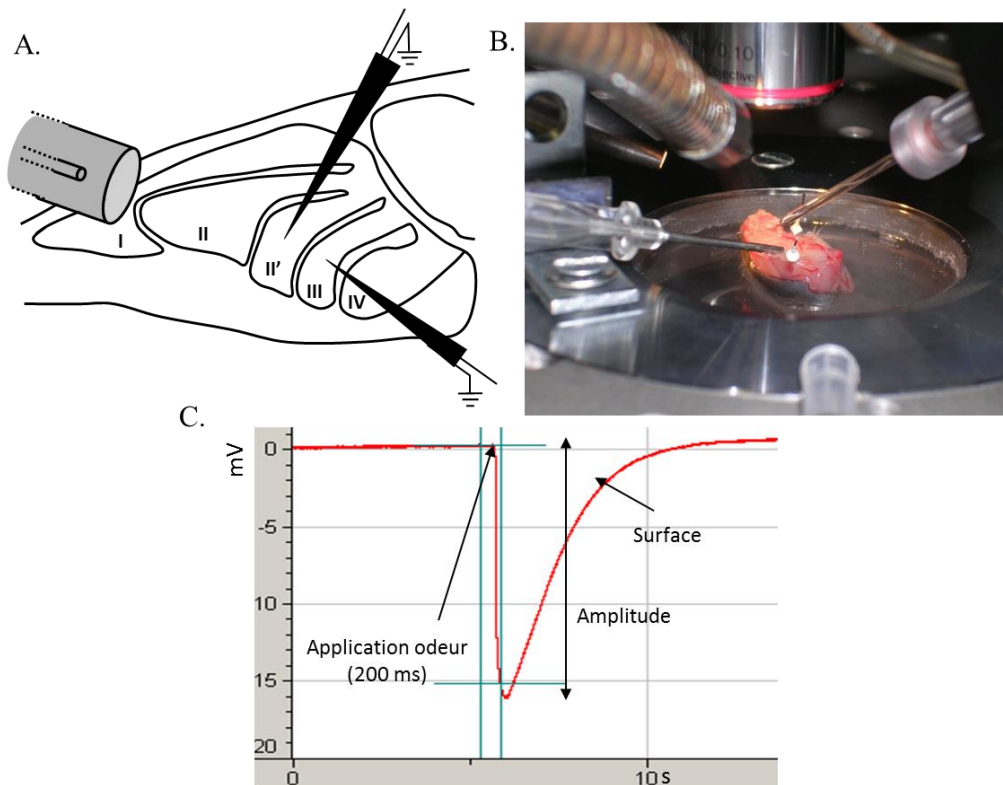
Le faible nombre d'animaux répondant au test olfactif que nous avons mis en place à un stade précoce, associé à la faible survie des individus à 48h (Cf partie II 2) de ce chapitre), nous ont posé question sur la capacité des animaux à réagir correctement aux stimuli olfactifs maternels. Ceci nous a conduits à tester leur sensibilité olfactive globale à un stade plus avancé de 12 jours par un test d'électro-olfactogramme (EOG) qui mesure l'amplitude de réponse électrique locale d'une population de NSOs suite à une stimulation odorante. Ce travail a été réalisé avec l'aide de Nicolas Meunier (MC, UVSQ). Nous avons quantifié l'effet éventuel de l'exposition odorante périnatale à l'heptanal. Notre hypothèse de travail était qu'une exposition périnatale à l'heptanal pourrait modifier la sensibilité de la MO envers ce composé odorant, ou de manière plus générale affecter la sensibilité olfactive des animaux.

### **1) Protocole expérimental**

Les souriceaux de 12 jours sont sacrifiés par dislocation cervicale. Immédiatement après la décapitation, la tête est coupée longitudinalement et le septum nasal est retiré d'une hémi-tête pour exposer les cornets. L'hémi-tête est placée dans une chambre d'enregistrement sous un stéréomicroscope Olympus SZ51 (Olympus, Rungis, FRANCE) équipé d'un objectif à faible grossissement (0,8 - 4×) et de deux micromanipulateurs MX-160 (Siskiyou, Inc., GrantsPass, OR, USA). Deux électrodes sont disposées au niveau des cornets II' (ou IIB) et III de la muqueuse olfactive (**Figure 40 A. et B.**). Le dispositif de stimulation des odeurs a été modifié à partir de Scott et Brierley ([Scott et Brierley, 1999](#)). L'hémi-tête est maintenue sous un flux constant d'air filtré humidifié (~ 1000 ml / min) délivré par un tube en verre de 9 mm à température ambiante. Ce tube est positionné à 2 cm de la surface épithéliale. Les stimulations d'odeur ont été réalisées par un flux d'air contrôlé par électrovanne (200 ms, 200 ml / min) à travers une pipette Pasteur échangeable enfermée dans le tube de verre contenant un papier filtre imprégné de 20 µl d'odorant. Les potentiels de champ, résultant de la sommation spatiale des potentiels récepteurs des neurones olfactifs situés à proximité des électrodes sont enregistrés (**Figure 40 C.**) avant pendant et après stimulation odorante. Pour

l'analyse des résultats, les amplitudes de ces potentiels de champ vont être comparées entre les groupes.

Pour chaque enregistrement, une première stimulation est effectuée avec un odorant contrôle, la L-Carvone, appliquée à 1/100 (volume/volume dans l'huile minérale), afin de vérifier que la préparation physiologique de muqueuse est en bon état. Puis, des stimulations successives avec une gamme d'odorants à tester sont appliquées.



**Figure 40** : ElectroOlfactoGramme (EOG) – **A.** et **B.** Dispositif utilisé pour les enregistrements et positionnement des électrodes d'enregistrement – **C.** Exemple d'enregistrement du potentiel de champ (mV) obtenu après une stimulation odorante au niveau des cornets de la muqueuse olfactive.

## 2) Résultats

Nous avons enregistré 9 souriceaux NO issus de 3 portées différentes et 9 souriceaux HEP issus de 3 portées différentes, d'âge compris entre 11 et 13 jours, en passant alternativement un animal de chaque groupe lors de 3 expérimentations indépendantes. Les cornets IIB et III ont été choisis pour réaliser les enregistrements, car pour des raisons pratiques, ce sont les plus accessibles pour pouvoir placer correctement les électrodes.

### a) Paramètres métaboliques : poids des souriceaux

L'analyse des valeurs de poids des souriceaux montre des poids très hétérogènes au sein de chaque groupe, allant de 5,07 à 9,53g avec une médiane de 6,58g pour le groupe NO et de 5,7 à 8,44g avec une médiane de 6,21g pour le groupe HEP, sans corrélation avec la taille de la portée (**Figure 41 A.**). Nous n'avons pas obtenu de différence significative (test Mann - Whitney) entre les 2 groupes.

### b) Enregistrements EOG

Les enregistrements ont été réalisés sur deux zones différentes de la MO : les cornets IIB et III. Néanmoins, compte tenu de la forte variabilité intra groupe dans les valeurs obtenues avec le cornet IIB, nous avons choisi dans cette analyse de ne tenir compte que des valeurs obtenues pour le cornet III.

Suite à la stimulation odorante avec la L-Carvone diluée au 1/100<sup>ème</sup> (volume/volume), odorant contrôle, nous avons obtenu des valeurs médianes d'amplitude de réponse de 6,1 mV pour le groupe NO et 7,8 mV pour le groupe HEP, et nous n'avons pas trouvé de différence significative entre les deux groupes d'animaux (Test de permutation) (**Figure 41 B.**).

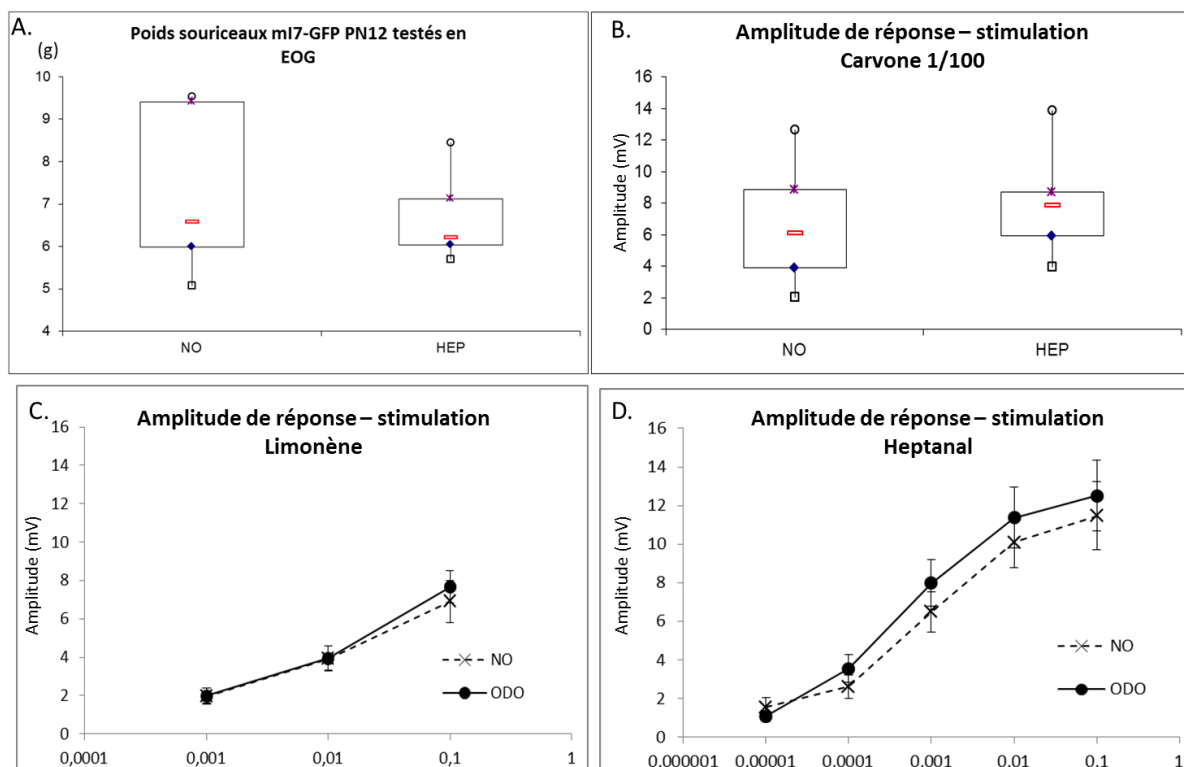
Nous avons également pu observer une hétérogénéité importante inter groupe dans les amplitudes de réponses.

Puis, des stimulations successives avec une gamme d'heptanal allant de 1/100000 à 1/10<sup>ème</sup> (volume/volume) ainsi qu'une gamme avec un odorant contrôle, le limonène, qui n'est pas un ligand du récepteur mI7, allant de 1/1000 à 1/10 (volume/volume).

Nous avons comparé les amplitudes de réponse EOG obtenues entre les 2 groupes avec les gammes de limonène et d'heptanal. Nous n'avons pas trouvé de différence entre les 2 groupes à l'application des 3 concentrations de limonène (**Figure 41 C.**), ni à l'application des 5 concentrations d'heptanal (Test permutation stratifié par concentration) (**Figure 41 D.**).

Ces résultats indiquent que l'exposition périnatale à l'heptanal n'affecte pas la réponse EOG à l'heptanal à PN12, ni aux autres odorants testés. Concernant la réponse au limonène, des animaux contrôles du même âge et de lignées différentes enregistrés dans les mêmes conditions dans l'unité NBO ont des amplitudes de réponse situées en général entre 10 et 15 mV (données non publiées). De plus, la forte hétérogénéité de poids des animaux souligne encore une fois la fragilité des souriceaux.

Compte-tenu du fait que les souriceaux testés présentent très probablement des retards de développement (petite taille), il est difficile d'émettre une conclusion sur les résultats obtenus.



**Figure 41** : Effets de l'odorisation sur la réponse obtenue en EOG – Enregistrements effectués sur des souriceaux *mI7-GFP* de 12 jours des 2 groupes NO (n=9) et HEP (n=9) – **A.** : Poids des animaux testés. **B.** : Amplitude de réponse suite à une stimulation odorante à la carvone 1/100 (vol/vol) – **C.** : Amplitude de réponse suite à des stimulations odorantes avec une gamme de limonène de de 1/1000 à 1/10 (vol/vol) – **D.** : Amplitude de réponse suite à des stimulations odorantes avec une gamme d'heptanal de 1/100000 à 1/10 (vol/vol)

### G. Changement de modèle suite aux problèmes rencontrés

Pour résumer l'ensemble des expérimentations sur le modèle souris *mI7-GFP*, malgré la mise en évidence de la présence d'heptanal dans le liquide amniotique ainsi que les laits PN3 et PN12 des souris *mI7-GFP* odorisées attestant que le modèle développé est valide, nous n'avons pas obtenu de différence comportementale à PN3 sur l'orientation des animaux vers un stimulus odorant, ni de différence dans l'amplitude de réponse aux stimulations odorantes par EOG à PN12. Sur le plan métabolique, outre le faible nombre de souriceaux/portée (4 en moyenne par portée), la forte mortalité périnatale de 50% sans lien avec l'exposition odorante (Cf ce chapitre II. B.) et une forte hétérogénéité de poids, nous avons été interpellés par la

fragilité comportementale des animaux. De plus, sur les tests PN3, environ 30% des souriceaux des 2 groupes n'ont pas été téter pendant le test. Ce pourcentage de souriceaux est anormalement important compte tenu du fait que la séparation maternelle aurait dû engendrer chez eux un regain d'activité et de motivation pour aller téter. Dans l'étude menée par Al Aïn et ses collaborateurs, à peine 10% des souriceaux testés à PN0 et PN1 n'avaient pas été téter la mamelle d'une femelle non apparentée en lactation (Al Aïn et al, 2013), confirmant ainsi le comportement anormal des souriceaux *mI7-GFP*.

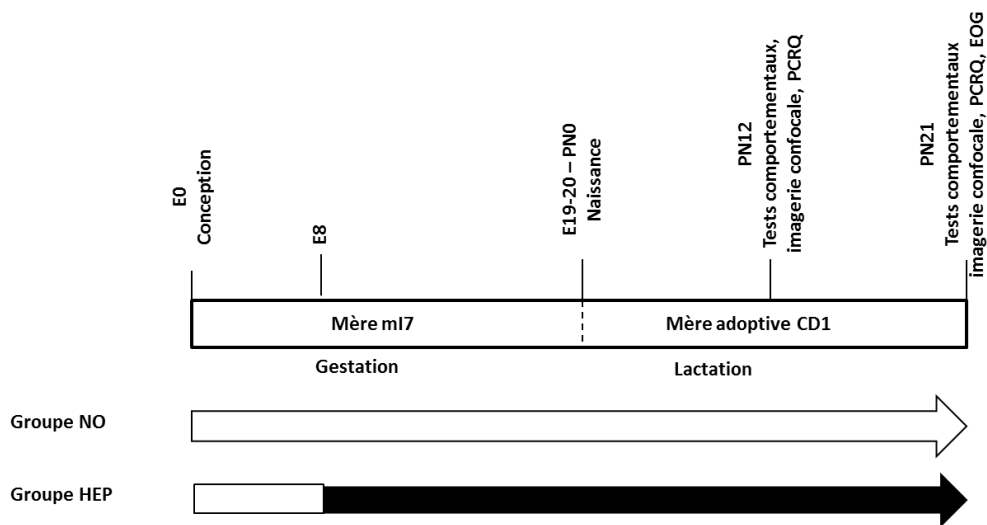
Suspectant des problèmes liés à la nutrition lactée post-natale, nous avons donc décidé de procéder à des adoptions des souriceaux *mI7-GFP* à la naissance par des femelles CD1, connues pour être de bonnes mères (taille moyenne des portées = 12 à 16 souriceaux), et répéter une partie des mesures comportementales sur des animaux élevés sous mère adoptive.

### **III. Validation du modèle d'odorisation : modèle de souris *mI7-GFP* adopté par des CD1**

#### **A. Protocole d'adoption**

La lignée de souris que nous avons sélectionnée pour réaliser les adoptions est la lignée CD-1. Nous avons commandé des couples fondateurs chez Janvier (Janvier Labs CS 4105 Le Genest-Saint-Isle, F-53941 Saint-Berthevin Cedex) puis nous avons nous-mêmes réalisé notre propre élevage pour amplifier le noyau de départ. Ces souris ont été choisies, car elles sont réputées pour apporter de bons soins maternels à leurs souriceaux (Cf fiche technique Janvier Labs, <http://www.janvier-labs.com/rodent-research-models-services/research-models/per-species/outbred-mice/product/swiss.html> ). Les animaux ont été élevés dans les mêmes conditions que décrites ci-dessus pour la lignée de souris *mI7-GFP* (Cf ce chapitre II A.). Les femelles sont mises en accouplement dès l'âge de 7 semaines et les mâles dès 8 semaines, seules des femelles multipares sont utilisées.

Pour chaque série, des femelles *mI7-GFP* et CD1 sont mises en accouplement en même temps ou avec un jour de décalage au profit des *mI7-GFP*, et odorisées à E8 dans les mêmes conditions. A la naissance, les souriceaux CD1 sont éliminés et les souriceaux *mI7-GFP* sont pesés, sexés puis imprégnés de l'odeur de la femelle CD1 en frottant leur corps dans du nid et de la litière souillée, avant de les déposer dans le nid de la femelle adoptive. Les souriceaux *mI7-GFP* sont donc élevés par des femelles CD1 jusqu'à 12 (PN12) ou 21 jours (PN21) pour être expérimentés selon le schéma suivant (**Figure 42**).

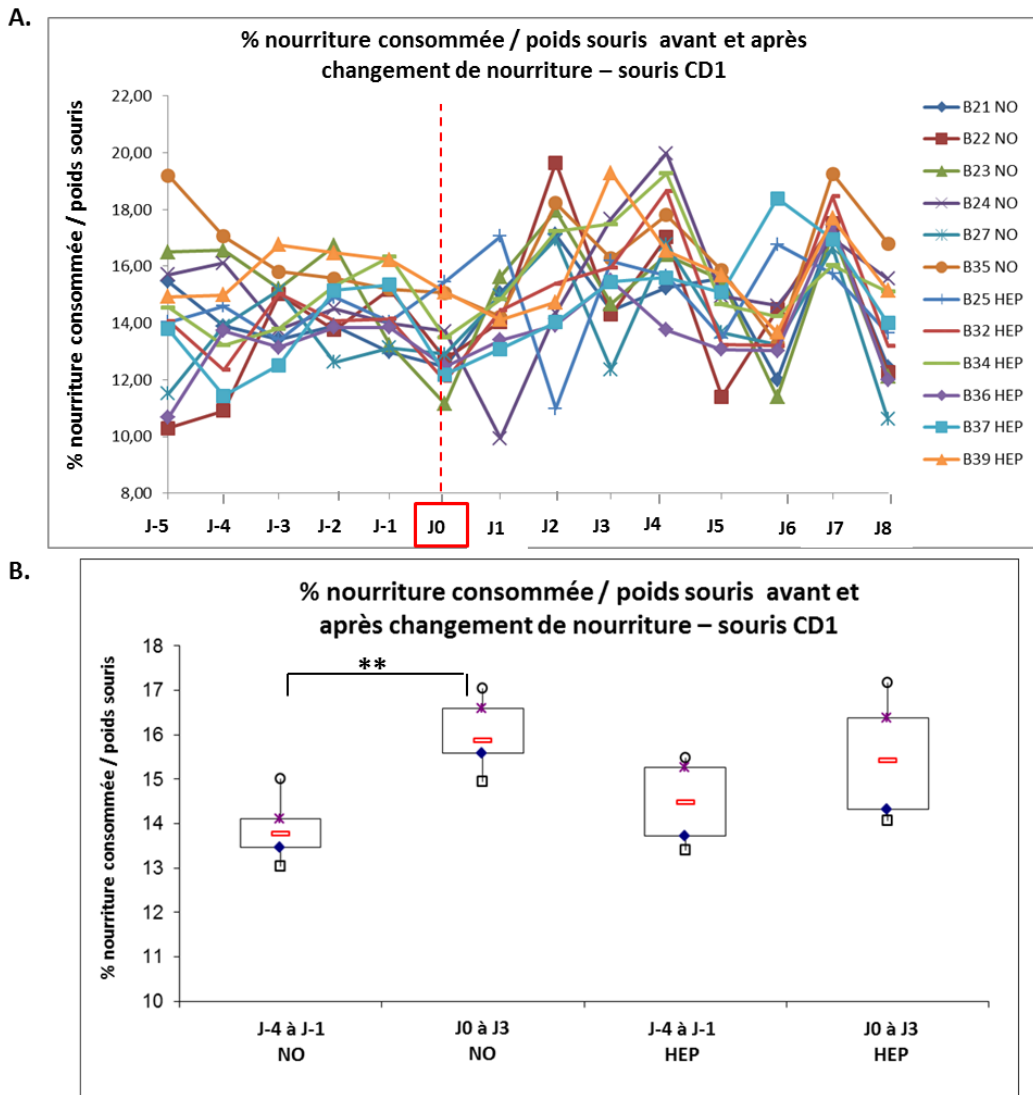


**Figure 42** : Plan d'odorisation et expériences effectuées sur les souriceaux *mI7-GFP* issus des 2 groupes – la partie pleine des flèches indique la période pendant laquelle les mères ont consommé des croquettes odorisées à l'heptanal 10% - Modèle de souris *mI7-GFP* adoptés par des mères CD1

## B. Consommation journalière en nourriture NO et HEP.

Afin de vérifier que les changements de nourriture et de cellule à E8 n'induisent pas d'effets notablement délétère sur la consommation alimentaire journalière chez les femelles CD1, nous avons pesé quotidiennement des femelles CD1 non gestantes et leur nourriture (6 femelles NO et 6 femelles HEP) pendant les 7 jours précédents et les 7 jours suivant le changement de nourriture. Nous avons dans un premier temps mesuré les variations de consommation en nourriture inter individus (**Figure 43 A.**). Puis, nous avons calculé le pourcentage moyen de nourriture consommée par rapport au poids de la souris pendant les 4 jours précédant et les 4 jours suivant le changement de nourriture pour les 2 groupes NO et HEP (**Figure 43 B.**).





**Figure 43** : Pourcentages de nourriture consommée par rapport au poids de la souris – Souris CD1 non gestantes – avant et après changement de croquettes (J0) – **A.** Courbes montrant les pourcentages de nourriture consommée rapportés au poids des souris pour chaque souris des 2 groupes NO et HEP – **B.** Graphique en box-plots montrant les pourcentages de nourriture consommée rapportés au poids des souris les 4 jours précédents et les 4 jours suivant le changement de nourriture et de cellule – groupe NO (n=7) et groupe HEP (n= 7) (test non paramétrique par permutation).

Si nous nous intéressons aux courbes de consommation individuelle (**Figure 43 A.**), nous pouvons voir des variations importantes inter individus et inter jours, pour les périodes entre J-7 et J-1 (avant changement de croquettes – souris nourries avec des croquettes standards) et entre J0 et J7 (après changement de croquettes – souris nourries avec des croquettes NO ou HEP). Le pourcentage moyen de nourriture consommé quotidiennement est de 14.2 % pour les 2 groupes les 7 jours avant le changement de croquettes, et de 15,7% pour les 2 groupes les 7 jours après le changement. Sur ces 2 périodes (avant et après changement),

les souris varient dans leur consommation en nourriture journalière et nous pouvons également observer des différences entre les souris. Néanmoins, les variations de consommation observées sont indépendantes du type de croquette consommé (NO ou HEP).

Si nous nous intéressons maintenant aux consommations moyennes en nourriture les 4 jours avant et les 4 jours après changement de croquettes (**Figure 43 B.**), nous n'obtenons pas de différence significative pour le groupe des HEP (médiane des pourcentages moyens par jour : 14,3% avant changement de croquettes et 15,5% après changement - test non paramétrique par permutation). Par contre, pour le groupe NO, les souris ont consommé significativement davantage de nourriture après le changement de croquettes (médiane des pourcentages moyens par jour : 14% avant changement de croquettes et 16,1% après changement - test non paramétrique par permutation  $p=0.004$ ). Nous n'avons pas observé de différence entre les 2 groupes NO et HEP dans la consommation.

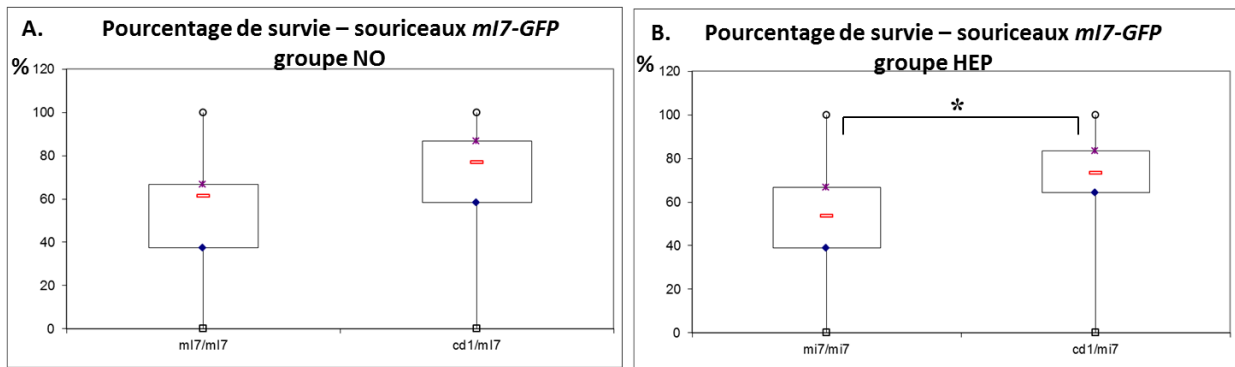
Bien qu'ayant un effet positif sur la consommation du lot des femelles non gestantes NO, dont nous ne connaissons pas l'origine, l'odorisation des croquettes odorisées ne semble pas affecter le niveau de consommation des souris *mI7-GFP*.

## C. Validation du modèle

### 1) Effets de l'adoption sur le pourcentage de survie des souriceaux

Afin de mesurer les effets de l'adoption par des mères CD1 sur la survie des souriceaux, nous avons effectué un comptage sur 15 portées du groupe NO et 16 portées du groupe HEP de souriceaux *mI7-GFP* adoptés à la naissance par des mères CD1 et calculé le pourcentage moyen de survie des souriceaux à 48h (**Figure 44**). La valeur médiane est de 77% pour les NO et 73% pour les HEP, avec de fortes variations entre portées, bien qu'il n'y ait pas d'effet de l'odorisation sur le pourcentage de survie des souriceaux adoptés (test de permutation). Ces variations sont essentiellement liées à des échecs d'adoption, certaines portées n'étant pas adoptées par la mère nourricière, ce qui conduit à une mortalité de 100%. Ces échecs d'adoption sont aussi fréquents chez les souris NO que les souris HEP (3 portées / 15 pour le groupe NO et 2 portée /16 pour le groupe HEP).

Nous avons ensuite comparé les résultats obtenus dans chaque groupe NO et HEP entre les souriceaux adoptés (*cd1/mI7*) ou non (*mI7/mI7*, cf II.2) (**Figure 44 A. et B.**).



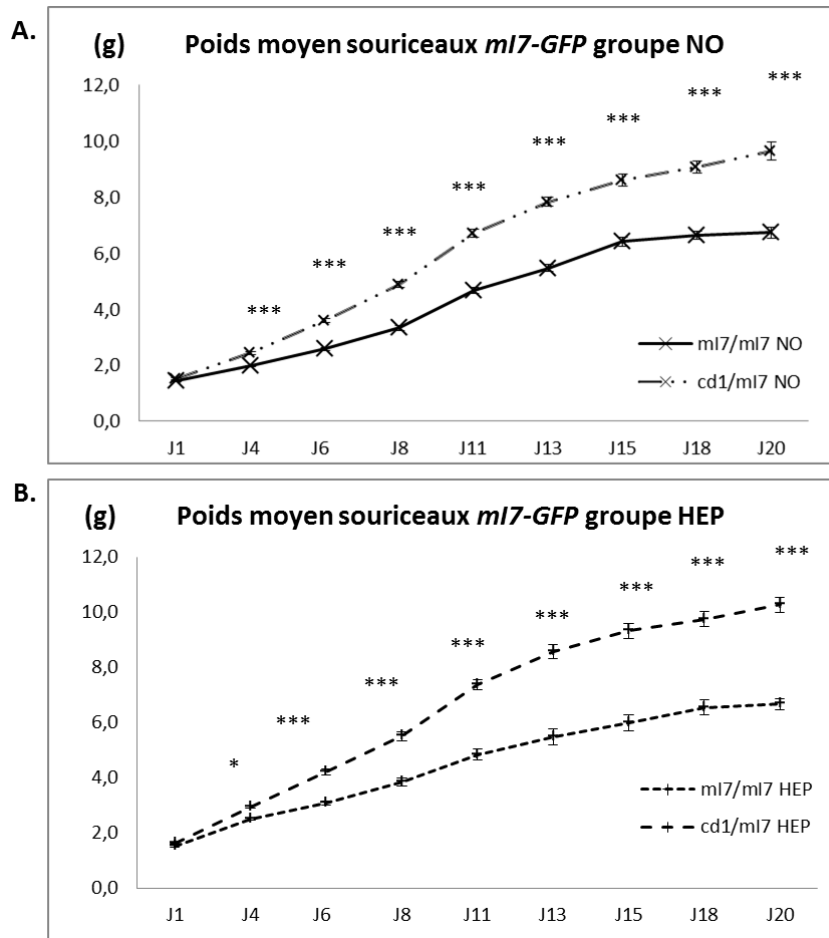
**Figure 44** : Validation du modèle *mI7-GFP* adopté – Pourcentage de survie dans les 48h suivant la naissance, souriceaux *mI7-GFP* adoptés (cd1/*mI7*) ou non (mI7/*mI7*) par des femelles CD1 – **A.** groupe NO – **B.** groupe HEP - (NO : mI7 non adoptés n = 26 portées et mI7 adoptés n = 11 portées – HEP : mI7 non adoptés n = 25 portées et mI7 adoptés n = 9 portées) (test non paramétrique par permutation).

Nous observons que le pourcentage de survie est significativement plus important pour les souriceaux *mI7-GFP* adoptés par rapport aux souriceaux *mI7-GFP* sous leur mère, d'une valeur médiane de 61,2% à 77% pour les NO et de 50% à 73,2% pour les HEP, bien que l'effet ne soit significatif que pour le groupe HEP, (test non paramétrique par permutation,  $p=0,022$ ).

L'adoption des souriceaux *mI7-GFP* par une mère adoptive CD1 améliore donc le pourcentage de survie dans la période critique pour cette lignée des 48h suivant la naissance, bien qu'il y ait un risque au rejet de la portée entière par la mère adoptive dans certains cas.

## 2) Effets de l'adoption sur la croissance des souriceaux

Nous avons également étudié les effets de l'adoption sur la croissance des souriceaux. Pour cela, nous avons pesé quotidiennement entre PN0 et PN20 des souriceaux *mI7-GFP* non adoptés (mI7/mI7) et adoptés (cd1/mI7) des 2 groupes NO et HEP (NO : mI7 non adoptés n = 27 petits issus de 7 portées et mI7 adoptés n = 29 petits issus de 6 portées – HEP : mI7 non adoptés n = 28 petits issus de 8 portées et mI7 adoptés n = 32 petits issus de 7 portées). Pour éviter le biais que peut apporter la taille des portées sur le poids moyen des petits, nous n'avons pris en considération pour ces mesures que les portées de 3 à 6 petits (**Figure 45 A. et B.**).



**Figure 45** : Validation du modèle *mI7-GFP* adopté – Courbe de croissance des souriceaux *mI7-GFP* adoptés (cd1/*mI7*) ou non (*mI7/mI7*) par des femelles CD1 - **A.** groupe NO – **B.** groupe HEP - (NO : *mI7* non adoptés n = 27 petits issus de 7 portées et *mI7* adoptés n = 29 petits issus de 6 portées – HEP : *mI7* non adoptés n = 28 petits issus de 8 portées et *mI7* adoptés n = 32 petits issus de 7 portées (test Kruskal-Wallis - \* : p<0,05 ; \*\* : p<0,01 ; \*\*\* : p<0,001).

Aussi bien pour le groupe NO que le groupe HEP, les souriceaux *mI7-GFP* adoptés par des mères CD1 ont un poids significativement supérieur à celui des souriceaux restés sous leur mère *mI7-GFP* (test Kruskal-Wallis - : p<0,05 ; \*\* : p<0,01 ; \*\*\* : p<0,001). L'adoption améliore donc également la croissance des souriceaux *mI7-GFP*.

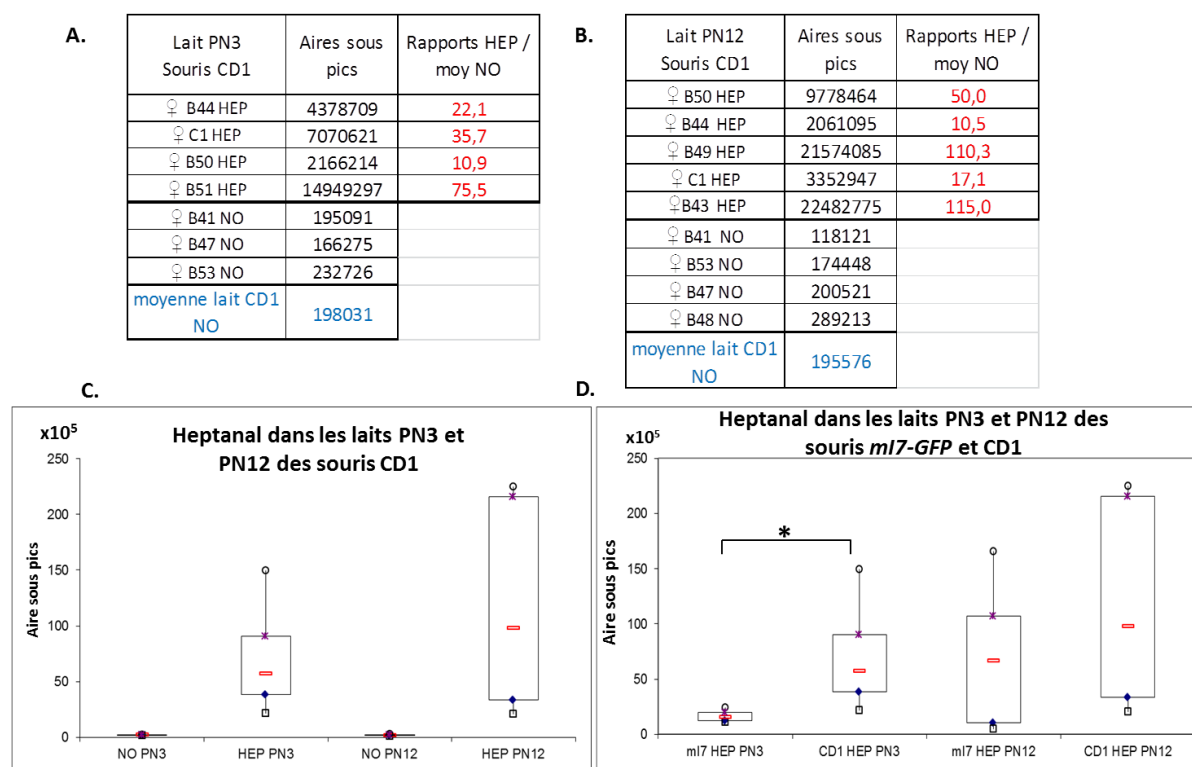
En conclusion des paragraphes 1) et 2), nous avons pu voir que l'adoption à la naissance des souriceaux *mI7-GFP* par des mères CD1 améliore leur taux de survie à 48h, et leur croissance à 20 jours. Les souriceaux sont donc plus nombreux et leur état physiologique est beaucoup plus satisfaisant.

### 3) Recherche de la présence d'heptanal dans le lait des souris CD1

Les souriceaux *mI7-GFP* allant être adoptés à la naissance par des mères CD1, ils seront donc sous alimentation lactée de mères CD1. Nous avons recherché la présence d'heptanal dans le lait des souris CD1 odorisées en comparaison des souris non odorisées. Les mêmes techniques de prélèvement et d'analyse en GC-MS/MS ont été utilisées (Cf ci-dessus II] D.).

Des prélèvements de lait à PN3 ont été effectués sur 3 femelles du groupe NO et 4 femelles du groupe HEP et à PN12 sur 4 femelles du groupe NO et 5 femelles du groupe HEP (volume 200 microlitres), certaines de ces femelles ayant été prélevées aux 2 stades, pour utiliser un nombre restreint de femelles.

Les résultats obtenus sont présentés dans la **Figure 46**.



**Figure 46** : Recherche de la présence d'heptanal dans les laits de souris CD1 par la technique de GC-MS/MS – **A.** et **B.** Tableaux récapitulatifs des valeurs d'aires sous pics et des rapports obtenus pour les lait PN3 **A.** et PN12 **B.** – **C.** et **D.** Graphiques en boxplot - Comparaison des valeurs d'aires sous pics obtenus entre le groupe NO et le groupe HEP pour le lait à PN3 et PN12 des souris CD1 **C.** et en comparaison entre les souris *mI7-GFP* et les souris CD1 **D.** (test non paramétrique par permutation).

A l'aide du calcul des rapports des aires sous pics, nous avons confirmé la présence d'heptanal dans les 4 laits PN3 et les 5 laits PN12 testés des souris CD1 HEP (rapports > 2,5) (**Figure 46 A. B.**). Cependant, une forte variabilité entre mères est observée, puisque les rapports obtenus varient entre 10,9 et 75,5 pour les laits PN3 et entre 10,5 et 115 pour les laits PN12. Nous n'avons pas effectué d'analyse statistique pour comparer les valeurs obtenues pour les laits entre les groupes NO et HEP car le nombre d'échantillons de laits PN3 et PN12 du groupe NO n'était pas suffisant. Néanmoins, la comparaison des aires sous pics montre une tendance des laits des mères HEP à contenir de l'heptanal par rapport aux laits des mères NO (**Figure 46 C.**). Comme pour les laits PN12 des souris *mI7-GFP* du groupe HEP (Cf ce chapitre II D.), nous avons pu mettre en évidence une grande disparité dans les valeurs obtenues pour les laits PN12 des souris CD1 du groupe HEP, traduisant des différences importantes inter individus dans la quantité d'heptanal.

Nous avons ensuite comparé les valeurs d'aires sous pics obtenues pour le lait entre les 2 lignées de souris *mI7-GFP* et CD1 du groupe HEP. Les analyses statistiques ont mis en évidence une présence d'heptanal en plus forte quantité dans le lait PN3 issu de femelles CD1 du groupe HEP comparés au lait issu de femelles *mI7-GFP* du groupe HEP (test non paramétrique par permutation,  $p=0,0095$ ). Le même effet semble être retrouvé avec les laits PN12 (non significatif) (**Figure 46 D.**).

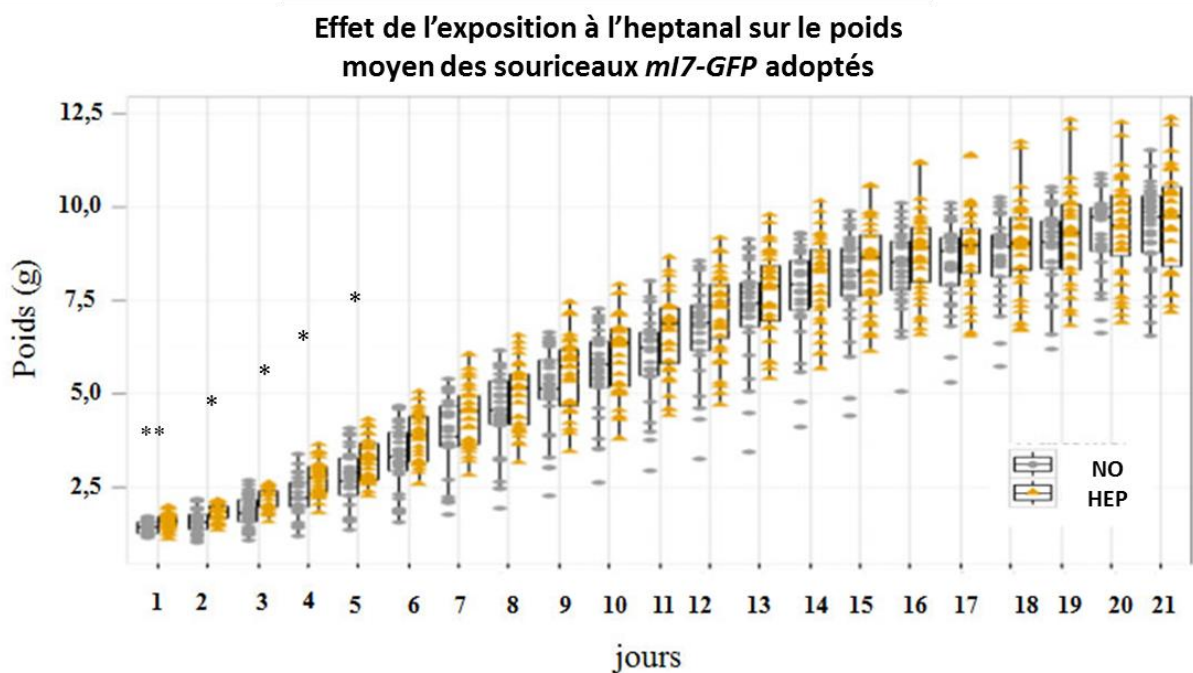
Nous avons donc validé la présence d'heptanal dans le lait des souris CD1 ayant consommé des croquettes odorisées à l'heptanal 10% en comparaison à des souris témoins. De plus, le lait des souris CD1 semble contenir davantage d'heptanal que celui des souris *mI7-GFP*. En plus d'améliorer l'état de santé général des souriceaux, l'adoption par des femelles CD1 permet également de renforcer l'odorisation à l'heptanal au démarrage de la lactation.

#### **4) Effets de l'exposition odorante à l'heptanal sur la croissance des souriceaux jusqu'au sevrage**

Nous avons enfin mesuré si l'effet de l'exposition odorante à l'heptanal pendant les périodes de gestation par les mères *mI7-GFP* et de lactation par les mères adoptives CD1 sur le poids des souriceaux *mI7-GFP*. Pour cela, nous avons comparé l'évolution des poids moyens obtenus pour des souriceaux adoptés du groupe NO par rapport à ceux du groupe HEP entre PN1 et PN21 sur les portées restreintes entre 4 et 6 petits (NO :  $n = 29$  petits / 6 portées – HEP :  $n = 32$  petits / 7 portées) (**Figure 47.**).

Nous avons observé que les souriceaux *mI7-GFP* du groupe HEP ont des poids significativement supérieurs aux souriceaux *mI7-GFP* du groupe NO entre PN1 et PN5, puis que cette différence disparaît ensuite (test Kruskal-Wallis).

A partir de PN6, l'odorisation périnatale à l'heptanal n'apporte donc pas de modification au niveau du poids moyen des souriceaux *mI7-GFP*.



**Figure 47** : Effet de l'exposition périnatale à l'heptanal sur la croissance des souriceaux *mI7-GFP* adoptés NO et HEP – Graphique en boxplots montrant le poids des souriceaux *mI7-GFP* adoptés des groupes NO et HEP en fonction du temps (test Kruskal-Wallis –  $p < 0,05$ ).

## 5) Conclusions

Après avoir rencontré un certain nombre de problème avec le modèle de souris *mI7-GFP*, nous avons décidé de pratiquer une adoption des souriceaux *mI7-GFP* par des mères CD1, connues pour être de bonnes mères.

En effet, nous avons montré que l'adoption améliorait :

- le pourcentage de survie des souriceaux dans les 48h suivant la naissance, permettant ainsi de disposer de davantage de souriceaux, malgré un risque de perte de la portée entière

- la croissance des souriceaux, ce qui laisse espérer que les souriceaux sont plus robustes et les portées plus homogènes en taille et en nombre pour réaliser des études comportementales.

Nous n'avons pas observé de différence notable entre les souris *mI7-GFP* et CD1 pour ce qui est du métabolisme général tel que nous l'avons mesuré (consommation alimentaire, croissance). Nous nous sommes assurés que le changement de croquettes à E8 ne perturbait pas la consommation en nourriture des souris *mI7-GFP* et CD1 et que l'odorisation périnatale à l'heptanal n'avait pas d'influence sur la croissance post-natale des souriceaux.

Nous avons montré la présence d'heptanal dans le liquide amniotique des souris *mI7-GFP* et le lait des souris CD1 après consommation de croquettes odorisées à l'heptanal 10%.

Cet effet spectaculaire de l'adoption sur la survie et la croissance des souriceaux *mI7-GFP* suggère un problème, non pas de fragilité de la lignée en tant que telle, mais de problèmes liés à la difficulté d'allaitement et/ou d'une mauvaise qualité du lait des mères *mI7-GFP*. Les raisons de ce problème ne sont pas décrites dans la littérature et ne sont pas systématiquement observées dans notre élevage, certaines mères *mI7-GFP* parvenant à élever des portées normales en taille et en nombre, mais de manière imprédictible sans lien avec leur âge et/ou leur statut d'odorisation. Malgré la lourdeur de la mise en place d'adoption systématique, nécessitant le doublement de l'élevage, nous avons choisi de continuer sur ce modèle murin d'exposition périnatale à l'heptanal, car il nous paraît suffisamment robuste et bien caractérisé pour pouvoir conduire l'ensemble de l'étude qui est décrite dans le chapitre II des résultats.



## **Chapitre II : Effets d'une exposition périnatale à l'heptanal sur les préférences médiées par l'olfaction et sur la plasticité du système olfactif**

Après avoir mis au point un modèle d'exposition périnatale à l'heptanal chez des souris *mI7-GFP* adoptés par des CD1 (Cf Résultats Chapitre I), nous avons étudié les conséquences phénotypiques de cette exposition odorante chez le jeune sur les comportements médiés par l'olfaction à différents stades de développement en utilisant des tests comportementaux à base olfactive (tests d'orientation, de choix). Afin de rechercher les mécanismes impliqués dans la plasticité du système olfactif sous stimulation odorante, j'ai complété cette approche intégrée par une approche moléculaire et cellulaire à deux niveaux complémentaires:

- dans la muqueuse en étudiant les conséquences de l'exposition odorante sur la dynamique cellulaire et la survie des neurones impliqués dans la reconnaissance de l'odorant par comptage des neurones GFP par qPCR,
- dans le bulbe, le premier relai cérébral de traitement de l'information odorante, en étudiant les changements morpho-fonctionnels opérés par l'exposition odorante.

L'ensemble des résultats obtenus sont présentés dans l'article qui suit. Cet article a été soumis au journal « Genes, Brain and Behavior » le 23/01/2017.

**Title page**

A chronic perinatal odour exposure with heptaldehyde affects odour sensitivity and olfactory system homeostasis in preweaning mice

Dewaele Aurélie<sup>1</sup>, Persuy Marie-Annick<sup>1</sup>, Badonnel Karine<sup>1</sup>, Meunier Nicolas<sup>1</sup>, Durieux Didier<sup>1</sup>, Castille Johan<sup>2</sup>, Favreau-Peigné Angélique<sup>1</sup> and Baly Christine<sup>1\*</sup>

**Running title**

Impact of odour exposure on olfactory sensitivity

**Keywords**

Olfaction, heptaldehyde, early life, maternal environment, plasticity, olfactory bulb, olfactory epithelium, behaviour, gene expression, electro-olfactogram,

**Affiliation:** <sup>1</sup>NBO, INRA, Université Paris-Saclay, 78350 Jouy-en-Josas, France.

<sup>2</sup> GABI, INRA, AgroParisTech, Université Paris-Saclay, 78350 Jouy-en-Josas, France

Phone : +33134652411

**\*Corresponding author:**

UR1197, Neurobiologie de l'Olfaction

Domaine de Vilvert

78350 Jouy-en-Josas, France

Phone: +33134652411; Email address: [christine.baly@jouy.inra.fr](mailto:christine.baly@jouy.inra.fr)

Date of submission 23/01/17

## Abstract

Exposure to specific odorants in the womb during pregnancy or in the milk during early nursing is known to impact morpho-functional development of the olfactory circuitry of pups, associated or not with a modification in olfactory sensitivity and behavioural olfactory-based preferences to the perinatally encountered odorants measured at birth, weaning or adult stage. The literature indicates that both amplitude and direction of effects of perinatal exposure largely depend on the experimental design, such as odorant type, concentration, administration mode and frequency, the exposure's window and the strain, suggesting that both pre- and post-natal exposures may have differential effects. Here, we examined the effect of a perinatal exposure to heptaldehyde on the neuro-anatomical development of the olfactory receptor *Olf2* circuitry, olfactory sensitivity and odour preferences of preweaning pups using *mI7-IRES-tau-green* fluorescent protein mice. We showed that the perinatal odour exposure through mother food lowers the response to heptaldehyde and modulates transcript levels of neuronal transduction proteins in the olfactory epithelium. Furthermore, the number of I7 glomeruli related to *Olf2*-expressing OSN is altered in a way similar to a restricted post-natal exposure, in a time-dependent way. Those variations are associated with a modification of olfactory behaviours associated to odour preferences at early stage that are amplified at weaning.

## Introduction

The mammalian olfactory system detects a large number of volatile chemicals taking advantage of millions of olfactory sensory neurons (OSN) expressing over thousand olfactory receptors (OR) genes, the largest mammalian gene family. Each OSN expresses only a single major OR gene (Malnic et al., 1999), and OSNs expressing a common OR project their axons to one or a few topographically stereotypical loci in the main olfactory bulb (MOB), called glomeruli, where they connect periglomerular and mitral cells. Such anatomically defined structures receive neural projections to process the olfactory signal before sending it to the olfactory cortex and the limbic system.

The development of the cartography of glomeruli in the olfactory bulb (OB), even if very complex, has been almost completely depicted in the past few years, first using in situ hybridization expression patterning of selected OR (Vassar et al., 1994, Ressler et al., 1994). Then, the availability of several transgenic mice strains expressing tagged-OR and fluorescent imaging strategies have provided the opportunity to accelerate the description of the specific wiring code of expressing OSNs for various ORs (Mombaerts et al., 1996a, Mombaerts et al., 1996b, Strotmann et al., 2000, Potter et al., 2001, Bozza et al., 2002, Feinstein and Mombaerts, 2004, Jones et al., 2008, Blanco-Hernandez et al., 2012). Comparisons of their anatomical organization indicate that most OSNs expressing a particular OR coalesce in at least two olfactory glomeruli, one in medial and the other in lateral side of the OB, in a relative conserved position within and between individuals suggesting a self-organizing developmental process (Strotmann et al., 2000, Soucy et al., 2009). A linear correlation between the number of OSN in the OM and the total volume of the corresponding glomeruli in the OB is observed (Bressel et al., 2016).

Despite important spatio-temporal heterogeneities observed among OR, the development of the OSN-glomeruli cartography during early life obeys to several rules: axonal targeting is roughly observed as early as embryonic day 15.5, some OSN can respond to odorants already before birth (Lam and Mombaerts, 2013), most functional structures are discernable perinatally and are mature by the third week after birth with the refinement of the multiple primary mitral/tufted cells during the first post-natal week (Pomeroy et al., 1990, Zou et al., 2004), a distinct rostral-to-caudal temporal gradient of glomerular development is described, with temporal and wiring differences according to the OSN position in the olfactory epithelium (OE) (Royal and Key, 1999, Potter et al., 2001), the olfactory mucosa (OM)-OB map mainly forms and refines during late embryonic and early postnatal life to provide a

glomerular map organization almost immutable later (Tsai and Barnea, 2014 ; Ma et al., 2014).

Thus, both OM and OB structures are intimately connected and any functional changes in the OM associated to environmental changes, such as a sensory-deprivation through occlusion or chemical lesion, or environmental odorant-enrichment during early life is associated to measurable effects. The consequences of odour exposure during gestation and/or prior to weaning on the development of the olfactory system and associated behaviours have been particularly investigated. Indeed, mother biological fluids, such as amniotic fluid, milk or saliva, contains many constituents originating from mother's dietary and environmental exposure, that bathes the young's sensory development, and makes the gestational period a sensitive one in flavour learning (Ventura and Worobey, 2013). In rodents, odours encountered *in utero* and/or during nursing elicit a significant preference for them at weaning, compared to a differentially flavoured diet or a control one (Smotherman, 1982, Nolte and Mason, 1995, Todrank et al., 2011, Liu et al., 2016). Such attracting behaviours could be observed early after birth, when odour exposure is restricted to the *in utero* period, in a way that helps odorant cues to participate to nipples attachment by acting on both locomotion and suckling of pups (Logan et al., 2012, Gaztanaga et al., 2015). However, attracting effects are attenuated, or even reversed, if odour exposure is performed after the first postnatal week or in a continuous exposure, probably leading to a passive desensitization (Woo and Leon, 1987, Barbour et al., 2008). Whether the odorant is considered as attractive or repulsive by the animal when presented for the first time could also bend odour-induced behaviours (Kerr and Belluscio, 2006, Saraiva et al., 2016). Therefore, effects on olfactory-based behaviours towards learned odorants also largely depend on the odour, the window of exposure, the way of its administration, the targeted OR and the strain used.

During the last decade, the deciphering of molecular bases of odour enrichment on the remodelling of the olfactory system during the perinatal period has been accelerated by the exploration on transgenic mice expressing tagged ORs and fluorescent associated glomeruli. Most have focused their study on the postnatal window and have all concluded to modulations at both levels which depend on the exposure window, the odorant chosen for the sensory-enrichment, the experimental design associated or not with conditioning, and the strain used (Valle-Leija, 2015).

In the OB, the chronic postnatal environmental exposure to odorants impacts the glomerular map in several ways, changing the intensity of neural activity without changing the spatial representation of the odorant (Woo et al., 2007). Neonatal conditioning of mutant mice

expressing an ectopic *Olf2r*-related glomerulus (named I7) with an aversive odorant, octanal, is associated with an acceleration of the glomerular refinement (Kerr and Belluscio, 2006). A chronic environmental exposure of *i7-T-GFP* and *M72-T-GFP* mice from birth to weaning to heptaldehyde or acetophenone induces an odour-specific increase in the number of targeted glomeruli, a larger one and other supernumerary glomeruli, that are formed post-natally (Valle-Leija et al., 2012). However, pre- and/or early post-natal chronic exposure through mother food to acetophenone or isopropyl tiglate only results in an odorant-specific increase in the size of the tagged glomerulus at weaning on *M71-* or *M72-* GFP-tagged mice, respectively, without effect on their number (Todrank et al., 2011). In that case, the main neuroanatomical effects result from the gestational exposure.

In the OM, studies evaluating the effect of perinatal odour exposure hardly conclude on effects on olfactory sensitivity of odorized pups on OSN population and/or function and make difficult any relationship with molecular or structural observations. The correlation between the number of OSN and the volume of the corresponding glomeruli in the OB suggests that any odour exposure-induced increase in the glomerular size should be associated to an increase in the number of targeted OSN (Bressel et al., 2016). Regarding the OSN number, postnatal odour exposure to pure odorants leads to an odorant-specific decrease in their density, but this effect is OR-dependent (Cadiou et al., 2014). When postnatal exposure is associated to conditioning, OSN population remains stable (Kerr and Belluscio, 2006). In individual neurons, postnatal odour exposure is associated to an increase of MOR23 transcript levels of mice daily exposed to lylal, the known ligand for MOR23 and of transcripts for *CNGA2* and *PDE1C*, two genes involved in the olfactory signal transduction pathway, while adenylyl cyclase III transcript levels remain unchanged (Cadiou et al., 2014). These effects are odorant-receptor specific, since there is no effect on these gene expression for *M71* mice exposed to acetophenone in the same conditions. Contradictory effects on the physiological properties at the whole level of the OM are observed. Increase, decrease or no effect on the electro-olfactogram response to the odorant after chronic postnatal odour exposure (Semke et al., 1995, Barbour et al., 2008, Cadiou et al., 2014), and data are missing for models resulting from perinatal exposure. Thus, despite its decisive effect on glomerular size and organization, few studies have explored the possible contribution of the exposure during the gestational phase on these parameters (Todrank et al., 2011).

We decided to explore the consequences of a chronic odour exposure from late gestation to the weaning period on a knock-in transgenic mice model generated by inserting IRES-TauGFP after the *mI7* receptor locus (Bozza et al., 2002). Although its expression is

prenatally acquired with visible glomeruli at birth ([Valle-Leija et al., 2012](#)), the tagged Olfr2 receptor expressed in mI7 mice has not been investigated for its odorant-induced plasticity upon perinatal exposure including the prenatal window. We hypothesized that the effects would be more pronounced than those described after a postnatal exposure only. We odorized mother food during gestation with heptaldehyde, the cognate ligand for the mouse Olfr2 receptor, which selectively activates target OSN at micromolar concentrations ([Krautwurst et al., 1998](#), [Zhao et al., 1998](#), [Araneda et al., 2000](#), [Bozza et al., 2002](#), [Tan et al., 2010](#)). Due to the vulnerability in the mI7 strain, a cross-fostering model using CD-1 swiss mice as adoptive mice was chosen to facilitate pup's survival and subsequent analyses. We measured the consequences of perinatal odour exposure at both PND12-14 and PND21, by examining neuro-anatomical and functional organization of OM and OB, and its association to olfactory-based behaviours.

## Material and methods

All experimental procedures used in the study were approved both by the Ethic Committee and the French Ministry of National Education, Higher Education and Research under the project number 01844.01, in accordance with the recommendations provided by the European Communities Council Directive of 24 November 1986 (86/609/EEC) and 2010/63/EU on the protection of animals used for scientific purposes. Accordingly, all efforts were done to minimize animal suffering. C.B. holds the Individual Authorization for Performing Experiments in Animals, including the animal experiments used in the present study, provided by the Préfecture des Yvelines (France), according to French and European laws (agreement#78-65).

### Animals

The gene targeted *mI7-IRES-tauGFP* mice (Bozza et al., 2002) was kindly provided by J. Reisert (Monell Chemical Senses Center, Pennsylvania, USA) and the swiss CD-1 mice, used for the cross-fostering at birth, were purchased from Janvier laboratories. Mice were housed in our local animal care facilities (UEIERP; Jouy-en-Josas, France). They were maintained in 12h light, 12 h dark cycles, in a temperature-controlled room at 22°C with free access to water and food pellets (M25; Dietex, Saint-Gratien, France).

Animals were individually housed from about 2 months old until their first mating. Only multipare parental mI7 and CD1 mice were then used in order to maximize parental care behaviours.

### Procedure

The experimental design of the study is recapitulated **Fig.1**.

#### *Odour exposure and cross-fostering*

Standard flavour laboratory mouse chow (M25 - Dietex) was scented (10 ml per 125 g crushed chow) with 10% heptaldehyde (Sigma-Aldrich, France) diluted in absolute alcohol, which corresponds to a 0.7M solution. For the control non-odorized (NO) group, the M25-Dietex was impregnated with alcohol 90% (10 ml per 125 g crushed chow). The flavor- or alcohol -supplemented pellets were overnight dried under a fume hood to allow alcohol evaporation before giving them *ad libitum* to the mothers. Food was changed every Monday,



Wednesday and Friday to maintain a significant level of odour exposure all along the gestation and lactation periods.

Multipare females and males of each of the two strains (*mI7-IRES-tauGFP* and CD-1 mice) were overnight mated, CD-1 one day before mI7 to limit the risk to give birth to mI7 pups without fostering mother. The next day at 9 am, females were examined for the presence of a vaginal plug and separated from males in individual cage. The day a plug was detected was considered to be day 0 of gestation (GD0.5). At GD8.5, pregnancy was ascertained by indicative weight change and females of the two strains were randomly allocated to one of two experimental conditions in separate rooms of the same size. One group received non-odorized food (NO group) and the other group (ODO group) received 10% heptaldehyde-odorized food until parturition. Cages of pregnant mice were enriched with nest material. All pups were born on GD19.5 or GD20.5 whatever the odour exposure conditions. At the day of birth, litters from mI7 mice were cross-fostered with a CD-1 mother of the same odour exposure status. As shown in **Fig. 1**, pups were tested at different days following birth before being sacrificed at PND21.

#### *GC-MS/MS*

To evaluate the presence of heptaldehyde in the amniotic fluid and milk samples of mI7 and CD-1 mice, GC-MS/MS analyses were performed on odorized or non-odorized biological samples collected from a series of dams. Twelve pregnant mI7 mice were sacrificed by cervical dislocation at GD14.5. Amniotic fluid from odorized (n=6) and control (n=6) mice were immediately collected from each fetus with a fine glass pipette, pooled and transferred in a glass tube and conserved at -20°C until analysis.

For milk collection, odorized or non-odorized CD-1 mice with pups at postnatal day PND3 (n=4 and n= 3, respectively) and PND12 (n=5 and n=4, respectively) were separated from their pups 4h before the sampling. They were injected with oxytocin (100U/kg) to accelerate milk production, then anesthetized by injection of ketamine-HCl and xylazine (100 mg/kg and 10 mg/kg body weight, respectively) 30 min later. The milk was collected manually in a glass pipette, by gently massaging the nipples, and then transferred to a glass tube and stored at -20°C until analysis.

Volatile components from 200 µl amniotic fluids or 80 µl milk prepared in 20 ml vials sealed by metal screw-caps with prenotched Teflon-silicone septa were extracted by Head Space-Solid Phase Microextraction (HS-SPME), using a 2 cm DVB/CAR/PDMS fibre (Supelco, Bellefonte, PA). The samples were shaken for 5 min using a 10 s on/off cycle at 60°C, and

subsequently volatile components were extracted during 5 min, then inserted into the injector port of the CG (Trace 1300, Thermo Scientific, USA) at 250 °C in the splitless mode (held 0.5 min). Separation of the volatile components was performed on a DB-FFAP column (60 m x 0.32 mm i.d., 1 mm film thickness) obtained from Agilent Technology. Helium was used as the carrier gas at a flow of 1.2 mL/min. The GC oven temperature program was started at 80°C and then programmed to 250°C at the rate of 10°C/min, staying at 250°C for 2 min. The mass spectrometer (TSQ 8000, Thermo) was operated in the electron impact (EI) ionization positive mode (70 eV). The temperature of the transfer line and the ion source were set at 250°C and 260°C, respectively. Argon was used as collision gas. The precursor ion, m/z 70 was chosen in the first quadrupole. The optimized conditions of detection of the product ions were as follows: m/z 70.00=> m/z 39 with 20 eV, m/z 70.00 => m/z 42.10 with 6 eV and m/z 70.00 =>m/z 55.10 with 6 eV.

#### *Olfactory 2-hole board preference test*

To evaluate the effect of a perinatal odour exposure on the postnatal olfactory preferences of pups, a 2-hole board test was performed at PND14 and PND21. The arena consisted in a rectangular transparent polycarbonate box apparatus (20 x 26 x 20 cm). The floor of the arena is drilled with 2 holes (diameter 0.5 cm) close to and at the halfway point of each of the short sides. Each hole could host a small filter paper, laid on two sliding drawers horizontally mobile, to permit changing of odorant sources during the test without disturbing animals. The odorant source is not accessible to the animals.

Pups of each litter (NO n=34 from 5 litters; ODO n=27 from 6 litters) were separated from their mother in a clean cage during 2 h of their light phase under a heat lamp at PND14, with water but no food, in a room separated from the breeding room to avoid interference with unwanted odor stimuli from conspecifics or with HEP. The hole-board test was performed from 2 to 4 pm.

Pups were individually placed in the middle of the arena at the beginning of the test. The test started with a 1.5 min habituation to the environment without any odorant source and a potential lateralization was evaluated during this phase. Then, the test consisted in a succession of two-choice tests with HEP at increasing concentrations ( $10^{-8}$ M,  $10^{-6}$ M and  $10^{-4}$ M, diluted in water, starting from a fresh  $10^{-1}$ M mere solution in ethanol) versus water control, disposed on a filter paper, then with heptaldehyde-odorized pellet versus non-odorized control pellet. Each two-choice test lasted 90 sec and two-choice tests were separated by a 30 sec interval during which the sliding drawers and the filter papers were

removed, the holes were cleaned with sterilized water and other filter papers/pellets were put in place for the next choice test. A blind observer registered the time spent sniffing each odorant source (*i.e.* poking its nose through the hole). The total time spent sniffing and the preference for the hole with heptanal (time spent sniffing the hole with heptanal/total time spent sniffing x 100) were then calculated for each animal. The first position of the odorized and non-odorized source was randomly chosen for each animal, and systematically inverted between two-choice tests. Moreover, animals from NO and ODO-exposed groups were alternatively tested to minimize any order bias. At the end of the hole-board test at PND14, pups were put back with their mother, and then kept in the same breeding conditions until a later board testing session, which occurred at PND21 in the same experimental conditions.

### *Confocal imaging*

To evaluate the effect of a perinatal odour exposure with heptaldehyde on the olfactory bulb organization, pups were sacrificed at PND12 (NO n=15 from 8 litters; ODO n=15 from 6 litters) and PND21 (NO n=17 from 8 litters; ODO n=13 from 6 litters) by decapitation or cervical dislocation, respectively. Olfactory bulbs were immediately removed, fixed in paraformaldehyde (PFA) 4% for 48h then harvested in phosphate-buffered saline (PBS) containing 0.4% PFA and 0.1% Tween-20 and kept at 4°C until observation. For technical reasons, only the medial left and right glomeruli were captured in whole mount, using a 20X objective on an inverted ZEISS LSM 700 microscope/camera using Zeiss Imaging Software. Each z-stack obtained from the entire block was then analyzed with FIDJI software in a blind manner. Background noise was removed using “process” “filters” “median”. The fluorescent foci in each image were delineated using ‘freehand selection’. The number of them was determinate by counting the number of fluorescent delimited zone on each z-stack. The intensity of fluorescence was then adjust using “image” “adjust” “threshold” and the volume of each glomerulus was calculated using “analyze” “3D objects counter”. The volume of each glomerulus ( $\mu\text{m}^3$ ) was calculated by summing the areas of each of the z-images of neighbouring glomeruli.

### *Quantitative RT-PCR*

To evaluate the effect of a perinatal odour exposure on the expression of Olfr2 receptor in the olfactory mucosa, we perform a RT-qPCR on the olfactory mucosa (OM) from pups of the 2 experimental groups at different ages.

Pups were sacrificed by decapitation at PND12 (n=12 NO from 6 litters; ODO n=15 from 9 litters) and PND21 (n=10 NO from 4 litters; n=17 ODO from 9 litters) and OM were immediately dissected out. Bones and cartilages were gently removed under a binocular microscope, and olfactory tissue was immediately frozen at -80°C.

Total RNA was extracted using the Qiagen RNeasy Plus Mini Kit following the manufacturer recommendations, then treated with DNase I to digest contaminant genomic DNA (Roche Diagnostics France, Meylan, France). Oligo dT first strand cDNA were synthesized from 2.5 µg total RNA by the Superscript II reverse transcriptase (Invitrogen, ThermoFisher Scientific) following the manufacturer recommendations.

qPCR amplifications were performed on StepOnePlus Fast Real-Time PCR system (Applied Biosystems) in a final volume of 20 µl with 10 µl of MESA Blue qPCR MasterMix Plus (Eurogentec Laboratories), 120 ng of cDNA, and 0.4 µM primers according to the manufacturer's specification. The following cycling parameters were applied: 95°C for 10 min and 40 cycles of amplification (95°C for 15 s; 60°C for 1 min). The gene specific primers sequences designed according to standard recommendations with Primer 3 and their sequence specificities analyzed using Blast of the Primer-Blast software package are given in Table 1. The uniqueness of PCR products obtained was controlled at the end of amplification using melting curve analysis.  $\Delta C_t$  was calculated by subtracting the  $C_t$  value of the targeted gene to the  $C_t$  value of the succinate-CoA ligase (*Suc1g1*) reference gene expression and plotted (Cadiou et al., 2014). The relative quantification levels of expression for genes of interest were analyzed using the  $\Delta\Delta C_t$  method ( $RQ = 2^{-\Delta\Delta C_t}$ ).

#### *Electro-olfactogram recordings (EOG)*

To evaluate the effect of a HEP perinatal odour exposure on the global responses of OSNs of pups at PND21, EOG recordings were made from the OM in an opened nasal cavity configuration as described earlier (Francois et al., 2013). Six pups for each experimental condition were sacrificed during light phase (9 to 11 am) and alternatively recorded to limit any circadian bias. Immediately after decapitation, the head was cut longitudinally and the nasal septum was removed from one hemi-head to expose the endoturbinates from which EOG recordings were performed at room temperature. The hemi-head was kept under a constant flow of humidified filtered air (1000 ml/min) delivered through a 9 mm glass tube. This tube was positioned 2 cm from the epithelial surface. Odour stimulations (Heptanoic acid 1:10, L-carvone 1:100, Limonene ranging from 1:1000 to 1:10, Heptaldehyde ranging from 1:100,000 to 1:10) were performed by blowing air puffs (200 ms, 200 ml/min) through an

exchangeable Pasteur pipette enclosed in the glass tube containing a filter paper impregnated with 20  $\mu$ L of odorant. Odorants were diluted in mineral oil (SigmaAldrich, Saint- Quentin Fallavier, France, catalog number: M3516). EOG voltage signals were recorded using an XtraCell2 channels amplifier (DIPSI, Chatillon, FRANCE) used in a DC current- clamp configuration ( $I = 0$ ), low-pass Bessel filtered at 1 KHz and digitized at a rate of 2 kHz using a Digidata 1322aA/D converter (Axon Instruments, Molecular Devices, UnionCity, CA, USA) interfaced to Pclamp 9.2 software (AxonInstruments). A reference Ag/AgCl electrode was placed on the frontal bone overlaying the olfactory bulb. Recordings were made with glass micropipettes of 4-5 M $\Omega$  filled with a saline solution from the centre of turbinate III. Odorant-free air stimulation (with mineral oil), always produced signals around 1mV amplitude. Analyses were performed using Clampfit 9.2 (Axon Instruments) in order to measure the peak amplitude. Data are expressed as mean  $\pm$  standard error of the mean (SEM).

#### *Statistical analyses*

Statistical analyses were performed using the Two-Sample Fisher-Pitman Permutation test of the R coin package. Differences between ODO and NO groups for GC-MS/MS, olfactory 2-hole board test, number and size of glomeruli, EOG recordings, OM gene expression analysis were considered to be significant when  $p < 0.05$  as \*,  $p < 0.01$  as \*\* and  $p < 0.001$  as \*\*\*. Values for lateralisation and HEP preferences data from the olfactory 2-hole board test were analysed using one sample t-test to test if mean is not equal to 50%. Statistical analyses revealed no effect of odorant exposure on individual weight of animals whatever their age (not shown). Moreover, data obtained from male and female animals were pooled, since we found no effect of gender on all the measured parameters (not shown).

## Results

### *GC-MS/MS analysis of biological fluids*

In order to verify if heptaldehyde (HEP) was efficiently transferred in biological maternal fluids of mice eating odorized food pellets, we characterized the level of HEP impregnation in the amniotic fluids of mI7 pregnant mice at GD14.5 and in the milk of the foster CD1 mothers at PND3 and PND12 using the GC-MS/MS as a reliable and sensitive method. Analytical evaluation of HEP levels in collected biological showed that the level of HEP was almost 4.5 fold higher in GD14.5 amniotic fluids of odorized mI7 mice than that of non-odorized mice (n=6 for each group, p=0.033, **Fig.2a**). In the milk of CD1 mother fed with NO food, there was no statistical difference between HEP levels at PND3 and PND12, therefore GC-MS/MS values for PND3 and PND12 NO milks were meant (**Fig. 2b**). Despite large inter-individuals quantitative variations, there was a 30-fold increase of HEP in milks of PND3 ODO mice compared to NO mice (n=4 and n= 7, respectively; p=0.003) and a 50-fold increase in milks of PND12 ODO mice compared to NO mice (n=5 and n=7, respectively; p=0.018). Therefore, we concluded that ODO mI7 pups were significantly impregnated with HEP during their intra-uterine life and postnatal growth in the pre-weaning period through maternal odorized pellets consumption.

### *Effect of perinatal odour exposure on mice sniffing activity in an olfactory 2-hole board test*

Mice sensitivity towards heptaldehyde cues was tested in successive two-choice tests towards increasing concentrations of HEP and odorized food pellets at both PND14 and PND21 on non-odorized (n=34 pups from 5 litters) and odorized pups (n= 26 from 6 litters) (**Fig. 3a** and **3b**, respectively). The habituation phase measuring the time spent sniffing the left and right holes revealed no lateralization on the sniffing time for empty holes and no effect of odour exposure conditions on total sniffing time (not shown). The total time spent sniffing each of the two holes and the preference for the odorized one were calculated for each of the four successive choice tests (three increasing heptaldehyde concentrations and food pellets). At PND14, seven NO and two ODO pups were discarded from the analysis, since their sniffing score was null whatever the conditions. There was no effect of odour exposure on the preference for the HEP-filled hole, whatever the HEP concentration ranging from  $10^{-8}$  to  $10^{-7}$ .

<sup>4</sup>M (**Fig. 3a**). However, at the lowest HEP concentration, the ODO group preferred the HEP hole (62% of preference vs. theoretical value of no choice (50%),  $p=0.027$ ). Finally, there was no other effect of odorization status on total sniffing time or preference when offered odorized food pellets in choice with non-odorized pellets (**Fig. 3a**).

At PND21 (**Fig. 3b**), total sniffing time was increased compared to PND14 stage, but was not different between groups (not shown). Only one ODO pup was discarded from the analysis, due to a lack of activity during the five consecutive tests. Pups of the ODO group preferred the HEP hole, whatever the odorant concentration (68% of preference vs. 50%,  $p=0.004$  at  $10^{-8}$ M, 74% of preference,  $p=0.001$  at  $10^{-6}$ M and 71% of preference,  $p=0.0005$  at  $10^{-4}$ M), whereas they did not preferred the HEP pellets. The NO group showed no preference for the HEP hole whatever the HEP concentration, but avoided the odorized pellets when offered in choice with control pellets (**Fig. 3b**,  $p=0.002$ ).

At  $10^{-6}$ M heptaldehyde concentration, the ODO group exhibited a greater preference for the odorized hole compared to the NO group ( $73.6\% \pm 6.4\%$  of preference vs.  $41.5\% \pm 5\%$ , respectively;  $p=0.0006$ ). They also showed a greater preference for the odorized food compared to the NO group ( $60.3\% \pm 6.2\%$  of preference vs.  $30.7\% \pm 5.7\%$ , respectively;  $p=0.001$ ; **Fig. 3b**). However, there was no difference between ODO and NO groups for other HEP concentrations (**Fig. 3b**).

Thus, exposure to a maternal odorized food during perinatal period triggered an age-dependent development of the odorant-guided preferences leading to an increased sniffing exploration time for HEP cues.

#### *Effect of perinatal odour exposure on olfactory bulb structure and functioning*

In order to measure if perinatal odour exposure was associated to a neuroanatomical modification of the *Olf2* circuitry in the olfactory bulb, we took advantage of the presence of tagged GFP glomeruli in the mI7-IRES-tau-GFP strain and compared the structure of the GFP-tagged glomeruli between odorized and non-odorized mI7-GFP pups using confocal microscopy at both PND12 and PND21. Due to problems of accessibility for the ventral glomerulus located near to the cribriform plate, only the medial one was imaged. 26 hemi-bulbs from 15 odorized (6 litters) or 15 non-odorized pups (8 litters) were dissected and imaged at postnatal day 12 (PND12), whereas 20 hemi-bulbs from 13 odorized (6 litters) and 28 hemi-bulbs from 17 non-odorized pups (8 litters) were imaged at PND21. Axonal convergence was globally precise, with discernable organization and structure visible at both

ages (**Fig. 4a and 4d**). Each of the nucleated-like foci forming a clear spherical fluorescent network composed of axon terminals from the Olfr2 OSNs was counted as a glomerulus. Considering that there was no significant variability in the number and size of glomeruli between the left and right medial bulb for animals where both hemi-bulb were imaged ( $p=0.9056$ ), we kept only the one giving the maximum value for each animal.

Odour exposure resulted in a higher number of I7 glomeruli related to Olfr2 OSN per animal at PND12 and PND21 compared to the NO animals (**Fig. 4b and 4e**). At PND12, there was a 2.5-fold increase in the number of glomeruli in ODO mice compared to the NO ones (five versus two,  $p=2 \cdot 10^{-6}$ ) (**Fig. 4b**). At PND21, a 2-fold increase in the number of glomeruli (four versus two, respectively;  $p=2 \cdot 10^{-4}$ ) was observed (**Fig. 4e**).

There was an effect of age on the number of glomeruli for the ODO group only, with a diminution of their number at PND21 compared to PND12 (five versus four between PND12 and PND21, respectively  $p=0.014$ ). When the total volume of glomeruli per hemi-bulb was calculated, we found no significant difference between non-odorized and odorized animals at PND12 (median volume of 237178 versus 153346  $\mu\text{m}^3$ ; **Fig. 4c**) and at PND21 (median volume of 257927.5  $\mu\text{m}^3$  versus 239198.3  $\mu\text{m}^3$ ; **Fig. 4f**), respectively.

Therefore, the perinatal odour exposure induces an early modification of the patterning of Olfr2 projections to the OB, with extra-glomeruli already visible at PND12.

### *EOG recording*

We monitored the EOG responses in the OM of ODO and NO mice to increasing concentrations of HEP (**Fig. 5a**), limonene (**Fig. 5b**), as well as responses for two other odorants, carvone and heptanoic acid (**Fig. 5c**). Carvone was used as a positive control, limonene as it was structurally different from HEP and heptanoic acid as a potential odorant created after HEP oxidation ([Battersby et al., 1979](#)). There was a global tendency of the ODO group to present a lower level of response to all odorant tested, which did reach statistical significance for the dose response to HEP, with a reduction of 22% of the depolarisation peak value at the highest concentration ( $p=0.0033$ ).

### *Effect of perinatal odour exposure on OM gene expression*

The effect of HEP exposure on gene expression in the OM at PND12 and PND21 was measured by RT-qPCR on a series of selected genes, including two OR genes (Olfr2 and Olfr56) and three genes belonging to the olfactory neuronal cell transcriptome, the type 3 adenylyl cyclase (AC3), the cyclic-nucleotide-gated A2 (CNGA2) and the  $\beta$ -tubulin III ( $\beta$ -



tub) (**Fig. 6**). Gene expression was normalized to the Succinate-CoA ligase ADP-forming,  $\beta$  subunit (Suclg), whose expression did not differ of more than one Ct between experimental groups (not shown). As shown in **Fig. 6a**, ODO and NO groups did not differ on the expression of the five genes tested at PND12 (n= 12 NO from 6 litters and n=14 ODO from 9 litters). However, at PND21, the expressions of three of the five OSN-related genes were significantly lower in the OM from ODO mice than NO ones, as shown by the significant increase in the  $\Delta$ Ct value in odorized samples (**Fig. 6b**). When expressed as RQ value, the expression of Olf2 gene was significantly higher (1.72 fold) in OM of NO mice than of ODO ones at PND21 (n= 10 NO from 6 litters and n=17 ODO from 9 litters; p=0.03), whereas the expression of Olf56, an heptaldehyde non-related OR, and of  $\beta$ -tubulin III, a marker of OSN was not affected by odorant exposure. The expression of CNGA2 (1.38 fold, p=0.01) and AC3 (1.75 fold, p=0.02) were also significantly higher in OM from NO mice than ODO ones at PND21. However, effects of odourisation on gene transcription levels were low, with RQ values below 2, suggesting that the perinatal odour exposure has slightly modified the OM functioning of ODO mice at weaning.

## Discussion

Taking together, our results demonstrate that a chronic perinatal odour exposure through mother food impacts pups olfactory-based behaviours. These changes are associated with an OM and OB neuronal plasticity in mI7-IRES-TauGFP odorized pups before weaning. GC-MS/MS validated HEP transfer in both amniotic and milk fluids of ODO mice, around birth and later, but also highlighted large inter-individuals and inter-fluids quantitative variations, as already observed (Desage et al., 1996, Hausner et al., 2008). As flavour concentration levels rapidly peak after their ingestion in the milk (Hausner et al., 2008, Nolte et al., 1992, Mennella et al., 1995), the observed variability could be related to the interval between mother food consumption and fluids collection, a parameter that was not standardized in our experiments, since food was *ad libitum*.

We confirm that the sensory experience encountered by animals during this sensitive period clearly instructs a modification of the olfactory system, which differentially shapes the OB by increasing the number of tagged glomeruli, and affects OM sensitivity as well as heptaldehyde-driven olfactory preferences of pups that was visible early and until weaning. Influence of passive odorant exposure during the perinatal period on odorant sensitivity, glomeruli folding or associated behaviours has been already investigated with other odorants in other models of GFP-tagged mice, but has never been investigated in a single study. In addition, we have compared both behavioural and molecular evolution of the effects of perinatal odorant exposure at two stages of the postnatal development in a model of early maturing glomeruli that has only been investigated for its postnatal plasticity (Kerr and Belluscio, 2006, Valle-Leija et al., 2012). In the mI7-IRES-TauGFP model, both medial and ventral I7 glomeruli are already formed at birth, contrariwise to M71, M72, MOR23 and S1 ones which are formed later (Potter et al., 2001, Valle-Leija et al., 2012, Lam and Mombaerts, 2013) and have been studied for their postnatal odorant-induced plasticity at weaning or later (Zou et al., 2004, Valle-Leija et al., 2012, Cadiou et al., 2014, Molinas et al., 2016, Liu et al., 2016). However, data suggest that sensory neurons present at birth are required to establish the converging projection pattern, whereas late-born neurons are not able to restore convergence (Ma et al., 2014). Thus, it was conceivable that the odorant prenatally encountered will interfere with axonal routing in developing pups at birth and thus lead to enhanced effects than a postnatal odour exposure one.

Accordingly, we observed a time-dependent reorganisation in the OM-OB circuitry, already visible at PND12 in the OB with the development of supernumerary glomeruli, before any measurable effects on gene expression in the OM. Our results fit with those reported by Valle-Leija for i7 and M72 mice after postnatal environmental exposure only (Valle-Leija et al., 2012), but not with those on M72 mice after perinatal mother food odorant exposure where a unique larger glomerulus is observed (Todrank et al., 2011, Liu et al., 2016). Thus, contrariwise to our initial hypothesis, adding *in utero* exposure did not modify, nor enhance or stabilize axonal convergence of I7 glomeruli at weaning, as observed for the M71 one (Todrank et al., 2011). Here, the perinatal heptaldehyde odour exposure impacted medial glomerular folding in the same way than a postnatal environmental exposure only, leading to the formation of supernumerary glomeruli at weaning, whose total size was close to the one calculated earlier (Valle-Leija et al., 2012). Therefore, despite the fact that *Olf2* is expressed *in utero*, prenatal odorant exposure didn't extensively change the magnitude of the redistribution of the glomerular volumes. Whether the same effect was observed for the ventral glomerulus was not investigated here, due to a problem of accessibility, but a recent study indicates that both lateral and medial M72 glomeruli are equally impacted by a perinatal odour exposure (Liu et al., 2016). Beside some subtle differences in the procedures, such discrepancies between laboratories could be related to differences in housing conditions, which are known to impact both glomerular volume and number (Oliva et al., 2010), but might also highlight OR-OSN specificities. More studies are needed in various OR/OSN populations before making any generalization, if possible, on the consequences of olfactory stimulation on the formation and plasticity of specific glomeruli (Valle-Leija, 2015).

The effect on the number of supernumerary glomeruli is larger at PND12, than at PND21, suggesting that their number is not consolidated at that age and might still mature later through axonal refinement in mI7 mice. Unlike Valle-Leija et al., (Valle-Leija et al., 2012), who demonstrated a stabilization of the number of supernumerary glomeruli becoming fixed in number at weaning and even growing in size in adults, we observed an age-dependent increase in size but a slight decrease in the number of I7 glomeruli between PND12 and PND21. The reason for such a discrepancy between the two studies on the same strain is unclear. It would be interesting to follow the neuroanatomical changes in OB of mI7 mice at later stages, to see whether these supernumerary glomeruli correspond to immature glomeruli and disappear after a post-natal refinement, or if they will persist later, as described for M71 and M72 late maturing glomeruli (Zou et al., 2004). Indeed, supernumerary glomeruli could result from a delay in the maturation process (Pomeroy et al., 1990, Kerr and Belluscio, 2006)

or correspond to the formation of functional permanent structures to answer to the increase in the activity linked to the odour exposure (Liu et al., 2016).

At the OM level, our results showed that *Olf2* olfactory circuitry displays a neuroanatomical and molecular plasticity after perinatal odour exposure at PND21, as it was observed in the case of MOR23 upon postnatal lyral odour exposure (Cadiou et al., 2014). The diminution in *Olf2* and in other neuronal-related genes expression in the OM of ODO pups was rather faint, but consistent with the decrease of EOG responses to HEP. Noteworthy, the decrease in gene expression was only significant for HEP suggesting a specificity of the odorant environment on OM plasticity as shown earlier (Cadiou et al., 2014). Such a functional adaptation might result from modulation in OSN number, OSN individual properties, modification of other odorant- responding OSN populations, or changes in OB connectivity properties as observed here and in other models (Cavallin et al., 2010, Cadiou et al., 2014, Liu et al., 2016, Geramita and Urban, 2016). To go further, it would be necessary to measure the modulation of electrophysiological responses to odorants and gene expression of individual *Olf2* neurons and to analyze the functional connectivity between OM and OB by deep imaging.

Finally, the exposure of fetus and pre-weaning mI7 pups to a single odorant significantly increased HEP-driven exploratory activity, and thus before weaning. Various studies on perinatal odorant exposure have mainly concluded to positive effects on pups orientation at birth and later (Smotherman, 1982, Nolte and Mason, 1995, Todrank et al., 2011, Al Ain et al., 2013, Liu et al., 2016), whereas others have described a peripheral desensitization in exploration tasks (Barbour et al., 2008). In our model, we showed that odorized pups were able to detect low concentrations of HEP, whereas NO pups did not, and that effects on behavioural responses, but not neuroanatomy, were amplified by age. The effect was already visible at PND14, but only for the lowest concentration and was obtained with low sniffing scores (around 2% of activity spent sniffing, not shown). At this age, pups have just opened their eyes, display low exploratory capacities and quickly get tired. In addition, hole-board tests are rarely performed before weaning in mice and use odour cues such as bedding from the home cage that are more attractive than single odorants or food, not eat at this age (Moldrich et al., 2013). At PND21, ODO pups exhibited a clear preference for HEP holes, whatever the concentration. This seems inconsistent with the functional and molecular data showing a lower responsiveness to HEP in the OM, a decrease in the number of OSN and the presence of supernumerary glomeruli in the OB. However, the 2-hole board behavioural test records the attractiveness of the odorant and not the sensitivity for the pup toward it. Other studies have already pointed out these discrepancies (Semke et al., 1995, Barbour et al., 2008,

Cadiou et al., 2014). As flavours preferences can be observed before the odour exposure has modified the OM-OB connections (Todrank et al., 2011), the behavioural effects linked to odorant exposure could find their mechanistic bases in neural structures regions more likely associated to postnatal learning and/or discrimination rather than peripheral sensitivity (Mandairon et al., 2006, Kass et al., 2013). It may be also that odorized mice just compensated the seemingly impaired peripheral detection of HEP as observed earlier (François et al., 2013).

Curiously, when HEP was added to food pellets, the effect of odorant exposure on olfactory preferences at PND21 was driven by the development of an aversion in the NO pups rather than of a preference in the ODO pups for the odorized one. The reason for that is unclear but may be due to the unfamiliarity of the HEP odour in NO pups. Since the rejection of HEP-containing sources by the NO group was not observed earlier with lower HEP concentrations, that prenatal exposure was shown to limit the aversive effects of odours (Schaal et al., 2000), and that HEP is classified as a neutral odorant in mice (Saraiva et al., 2016), the NO avoidance behaviour was more likely due to the relative high concentration of HEP in odorized pellets. Alternatively, confounding effects linked to other sensory cues associated to pellets composition that antagonizes the HEP effect in ODO pups might be involved. It remains to determine whether these olfactory preferences are stable in time after weaning, reversed upon odour exposure stop and if they will lead to effects on the consumption of food. In conclusion, we showed here that a perinatal odour exposure through mother food exerts effects in several levels of the olfactory system. It lowers the electrophysiological response to odorant as well as the transcription of genes related to its transduction in the olfactory epithelium in mice. Furthermore, the number of related glomeruli is altered in a way similar to a restricted post-natal exposure, in a time-dependent way. Those variations are associated with a modification of olfactory-based behaviours driving odour preferences at early stage that are amplified at weaning.

## References

- Al Ain, S., Chraïti, A., Schaal, B. & Patris, B. 2013. Orientation of newborn mice to lactating females: identifying biological substrates of semiochemical interest. *Dev Psychobiol*, 55, 113-24.
- Araneda, R. C., Kini, A. D. & Firestein, S. 2000. The molecular receptive range of an odorant receptor. *Nat Neurosci*, 3, 1248-55.
- Barbour, J., Neuhaus, E. M., Piechura, H., Stoepel, N., Mashukova, A., Brunert, D., Sitek, B., Stuhler, K., Meyer, H. E., Hatt, H. & Warscheid, B. 2008. New insight into stimulus-induced plasticity of the olfactory epithelium in *Mus musculus* by quantitative proteomics. *J Proteome Res*, 7, 1594-605.
- Battersby, A. R., Buckley, D. G. & Staunton, J. 1979. Studies of enzyme-mediated reactions. Part II. Experiments on the dismutation of aldehyde to alcohol and carboxylic acid by the complex of liver alcohol dehydrogenase and NAD. *J Chem Soc Perkin 1*, 10, 2559-62.
- Blanco-Hernandez, E., Valle-Leija, P., Zomosa-Signoret, V., Drucker-Colin, R. & Vidaltamayo, R. 2012. Odor memory stability after reinnervation of the olfactory bulb. *PLoS One*, 7, e46338.
- Bozza, T., Feinstein, P., Zheng, C. & Mombaerts, P. 2002. Odorant receptor expression defines functional units in the mouse olfactory system. *J Neurosci*, 22, 3033-43.
- Bressel, O. C., Khan, M. & Mombaerts, P. 2016. Linear correlation between the number of olfactory sensory neurons expressing a given mouse odorant receptor gene and the total volume of the corresponding glomeruli in the olfactory bulb. *J Comp Neurol*, 524, 199-209.
- Cadiou, H., Aoude, I., Tazir, B., Molinas, A., Fenech, C., Meunier, N. & Grosmaître, X. 2014. Postnatal odorant exposure induces peripheral olfactory plasticity at the cellular level. *J Neurosci*, 34, 4857-70.
- Cavallin, M. A., Powell, K., Biju, K. C. & Fadool, D. A. 2010. State-dependent sculpting of olfactory sensory neurons is attributed to sensory enrichment, odor deprivation, and aging. *Neurosci Lett*, 483, 90-5.
- Desage, M., Schaal, B., Soubeyrand, J., Orgeur, P. & Brazier, J. L. 1996. Gas chromatographic-mass spectrometric method to characterise the transfer of dietary odorous compounds into plasma and milk. *J Chromatogr B Biomed Appl*, 678, 205-10.
- Feinstein, P. & Mombaerts, P. 2004. A contextual model for axonal sorting into glomeruli in the mouse olfactory system. *Cell*, 117, 817-31.
- Francois, A., Laziz, I., Rimbaud, S., Grebert, D., Durieux, D., Pajot-Augy, E. & Meunier, N. 2013. Early survival factor deprivation in the olfactory epithelium enhances activity-driven survival. *Front Cell Neurosci*, 7, 271.
- Gaztanaga, M., Aranda-Fernandez, P. E. & Chotro, M. G. 2015. Prenatal exposure to vanilla or alcohol induces crawling after these odors in the neonate rat: The role of mu and kappa opioid receptor systems. *Physiol Behav*, 148, 58-64.
- Geramita, M. & Urban, N. N. 2016. Postnatal Odor Exposure Increases the Strength of Interglomerular Lateral Inhibition onto Olfactory Bulb Tufted Cells. *J Neurosci*, 36, 12321-12327.
- Hausner, H., Bredie, W. L., Molgaard, C., Petersen, M. A. & Møller, P. 2008. Differential transfer of dietary flavour compounds into human breast milk. *Physiol Behav*, 95, 118-24.
- Jones, S. V., Choi, D. C., Davis, M. & Ressler, K. J. 2008. Learning-dependent structural plasticity in the adult olfactory pathway. *J Neurosci*, 28, 13106-11.

- Kass, M. D., Pottackal, J., Turkel, D. J. & McGann, J. P. 2013. Changes in the neural representation of odorants after olfactory deprivation in the adult mouse olfactory bulb. *Chem Senses*, 38, 77-89.
- Kerr, M. A. & Belluscio, L. 2006. Olfactory experience accelerates glomerular refinement in the mammalian olfactory bulb. *Nat Neurosci*, 9, 484-6.
- Krautwurst, D., Yau, K. W. & Reed, R. R. 1998. Identification of ligands for olfactory receptors by functional expression of a receptor library. *Cell*, 95, 917-26.
- Lam, R. S. & Mombaerts, P. 2013. Odorant responsiveness of embryonic mouse olfactory sensory neurons expressing the odorant receptors S1 or MOR23. *Eur J Neurosci*, 38, 2210-7.
- Liu, A., Savva, S. & Urban, N. N. 2016. Early Odorant Exposure Increases the Number of Mitral and Tufted Cells Associated with a Single Glomerulus. *J Neurosci*, 36, 11646-11653.
- Logan, D. W., Brunet, L. J., Webb, W. R., Cutforth, T., Ngai, J. & Stowers, L. 2012. Learned recognition of maternal signature odors mediates the first suckling episode in mice. *Curr Biol*, 22, 1998-2007.
- Ma, L., Wu, Y., Qiu, Q., Scheerer, H., Moran, A. & Yu, C. R. 2014. A developmental switch of axon targeting in the continuously regenerating mouse olfactory system. *Science*, 344, 194-7.
- Malnic, B., Hirono, J., Sato, T. & Buck, L. B. 1999. Combinatorial receptor codes for odors. *Cell*, 96, 713-23.
- Mandairon, N., Stack, C., Kiselycznyk, C. & Linster, C. 2006. Enrichment to odors improves olfactory discrimination in adult rats. *Behav Neurosci*, 120, 173-9.
- Mennella, J. A., Johnson, A. & Beauchamp, G. K. 1995. Garlic ingestion by pregnant women alters the odor of amniotic fluid. *Chem Senses*, 20, 207-9.
- Moldrich, R. X., Leange, G., She, D., Dolan-Evans, E., Nelson, M., Reza, N. & Reutens, D. C. 2013. Inhibition of histone deacetylase in utero causes sociability deficits in postnatal mice. *Behav Brain Res*, 257, 253-64.
- Molinas, A., Aoude, I., Soubeyre, V., Tazir, B., Cadiou, H. & Grosmaître, X. 2016. Anatomical and molecular consequences of Unilateral Naris Closure on two populations of olfactory sensory neurons expressing defined odorant receptors. *Neurosci Lett*, 626, 42-7.
- Mombaerts, P., Wang, F., Dulac, C., Chao, S. K., Nemes, A., Mendelsohn, M., Edmondson, J. & Axel, R. 1996a. Visualizing an olfactory sensory map. *Cell*, 87, 675-86.
- Mombaerts, P., Wang, F., Dulac, C., Vassar, R., Chao, S. K., Nemes, A., Mendelsohn, M., Edmondson, J. & Axel, R. 1996b. The molecular biology of olfactory perception. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 61, 135-45.
- Nolte, D. L. & Mason, J. R. 1995. Maternal ingestion of ortho-aminoacetophenone during gestation affects intake by offspring. *Physiol Behav*, 58, 925-8.
- Nolte, D. L., Provenza, F. D., Callan, R. & Panter, K. E. 1992. Garlic in the ovine fetal environment. *Physiol Behav*, 52, 1091-3.
- Oliva, A. M., Salcedo, E., Hellier, J. L., Ly, X., Koka, K., Tollin, D. J. & Restrepo, D. 2010. Toward a mouse neuroethology in the laboratory environment. *PLoS One*, 5, e11359.
- Pomeroy, S. L., Lamantia, A. S. & Purves, D. 1990. Postnatal construction of neural circuitry in the mouse olfactory bulb. *J Neurosci*, 10, 1952-66.
- Potter, S. M., Zheng, C., Koos, D. S., Feinstein, P., Fraser, S. E. & Mombaerts, P. 2001. Structure and emergence of specific olfactory glomeruli in the mouse. *J Neurosci*, 21, 9713-23.

- Ressler, K. J., Sullivan, S. L. & Buck, L. B. 1994. Information coding in the olfactory system: evidence for a stereotyped and highly organized epitope map in the olfactory bulb. *Cell*, 79, 1245-55.
- Royal, S. J. & Key, B. 1999. Development of P2 olfactory glomeruli in P2-internal ribosome entry site-tau-LacZ transgenic mice. *J Neurosci*, 19, 9856-64.
- Saraiva, L. R., Kondoh, K., Ye, X., Yoon, K. H., Hernandez, M. & Buck, L. B. 2016. Combinatorial effects of odorants on mouse behavior. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 113, E3300-6.
- Schaal, B., Marlier, L. & Soussignan, R. 2000. Human fetuses learn odours from their pregnant mother's diet. *Chem Senses*, 25, 729-37.
- Semke, E., Distel, H. & Hudson, R. 1995. Specific enhancement of olfactory receptor sensitivity associated with foetal learning of food odors in the rabbit. *Naturwissenschaften*, 82, 148-9.
- Smotherman, W. P. 1982. In utero chemosensory experience alters taste preferences and corticosterone responsiveness. *Behav Neural Biol*, 36, 61-8.
- Soucy, E. R., Albeanu, D. F., Fantana, A. L., Murthy, V. N. & Meister, M. 2009. Precision and diversity in an odor map on the olfactory bulb. *Nat Neurosci*, 12, 210-20.
- Strotmann, J., Conzelmann, S., Beck, A., Feinstein, P., Breer, H. & Mombaerts, P. 2000. Local permutations in the glomerular array of the mouse olfactory bulb. *J Neurosci*, 20, 6927-38.
- Tan, J., Savigner, A., Ma, M. & Luo, M. 2010. Odor information processing by the olfactory bulb analyzed in gene-targeted mice. *Neuron*, 65, 912-26.
- Todrank, J., Heth, G. & Restrepo, D. 2011. Effects of in utero odorant exposure on neuroanatomical development of the olfactory bulb and odour preferences. *Proc Biol Sci*, 278, 1949-55.
- Tsai, L. & Barnea, G. 2014. A critical period defined by axon-targeting mechanisms in the murine olfactory bulb. *Science*, 344, 197-200.
- Valle-Leija, P. 2015. Odorant receptors signaling instructs the development and plasticity of the glomerular map. *Neural Plast*, 2015, 975367.
- Valle-Leija, P., Blanco-Hernandez, E., Drucker-Colin, R., Gutierrez-Ospina, G. & Vidaltamayo, R. 2012. Supernumerary formation of olfactory glomeruli induced by chronic odorant exposure: a constructivist expression of neural plasticity. *PLoS One*, 7, e35358.
- Vassar, R., Chao, S. K., Sitcheran, R., Nunez, J. M., Vosshall, L. B. & Axel, R. 1994. Topographic organization of sensory projections to the olfactory bulb. *Cell*, 79, 981-91.
- Ventura, A. K. & Worobey, J. 2013. Early influences on the development of food preferences. *Curr Biol*, 23, R401-8.
- Woo, C. C., Hingco, E. E., Johnson, B. A. & Leon, M. 2007. Broad activation of the glomerular layer enhances subsequent olfactory responses. *Chem Senses*, 32, 51-5.
- Woo, C. C. & Leon, M. 1987. Sensitive period for neural and behavioral response development to learned odors. *Brain Res*, 433, 309-13.
- Zhao, H., Ivic, L., Otaki, J. M., Hashimoto, M., Mikoshiba, K. & Firestein, S. 1998. Functional expression of a mammalian odorant receptor. *Science*, 279, 237-42.
- Zou, D. J., Feinstein, P., Rivers, A. L., Mathews, G. A., Kim, A., Greer, C. A., Mombaerts, P. & Firestein, S. 2004. Postnatal refinement of peripheral olfactory projections. *Science*, 304, 1976-9.



**Acknowledgments:**

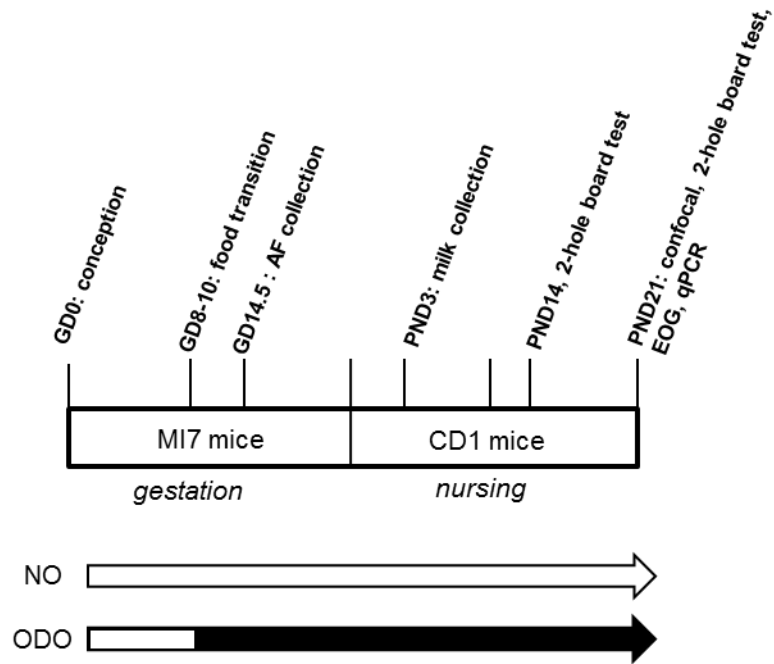
This work was financed by the Institut National de la Recherche Agronomique (INRA) through an incentive program research grant supported by C.B. A.D. is a PhD student. Authors thank Dr J. Reisert for the generous gift of mI7-IRES-tauGFP mice, and UEIERP (INRA, Jouy-en-Josas, France) for excellent animal care and housing facilities. A special thank to Pierre Adenot (Plateforme MIMA2, INRA, Jouy-en-Josas, France) for confocal facilities and help in images collection, Bruno Passet (INRA, Jouy-en-Josas, France) for the collection of maternal fluids, Isabelle Pellerin (*Plateforme de Chimie Analytique et Spectroscopie*, UPMC, Paris, France) for GC-MS/MS facilities. A special thank to Frederic Levy (INRA, UMR 6175, Nouzilly, France), Hirc Gurden (UMR 8165, Orsay, France), and H. Kiefer (UMR1198, Jouy-en-Josas, France) who were in charge of the other work packages of the INRA incentive project for insightful discussions and comments.

Author contributions: CB did the conception and design of the research; A.D., M.A.P., N.M., D.D., J.C. and C.B. performed the experiments; A.D., M.A.P., K.B., N.M., A.F.P. and C.B. analyzed and interpreted the data; A.D., M.A.P., K.B., and C.B. drafted the paper; K.B. prepared the figures and the statistical analysis; M.A.P., N.M. A.F.P. and C.B. edited and revised the manuscript; A.D., M.A.P., N.M., D.D., J.C., A.F.P. and C.B. approved the final version of the manuscript.

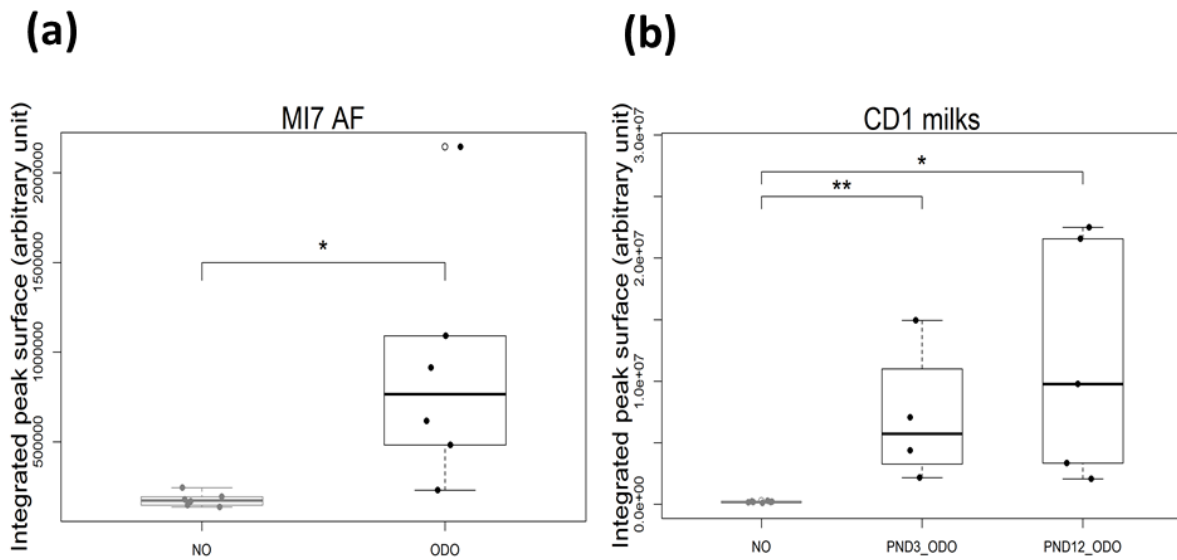
The authors have no competing financial interests to declare

## Figures

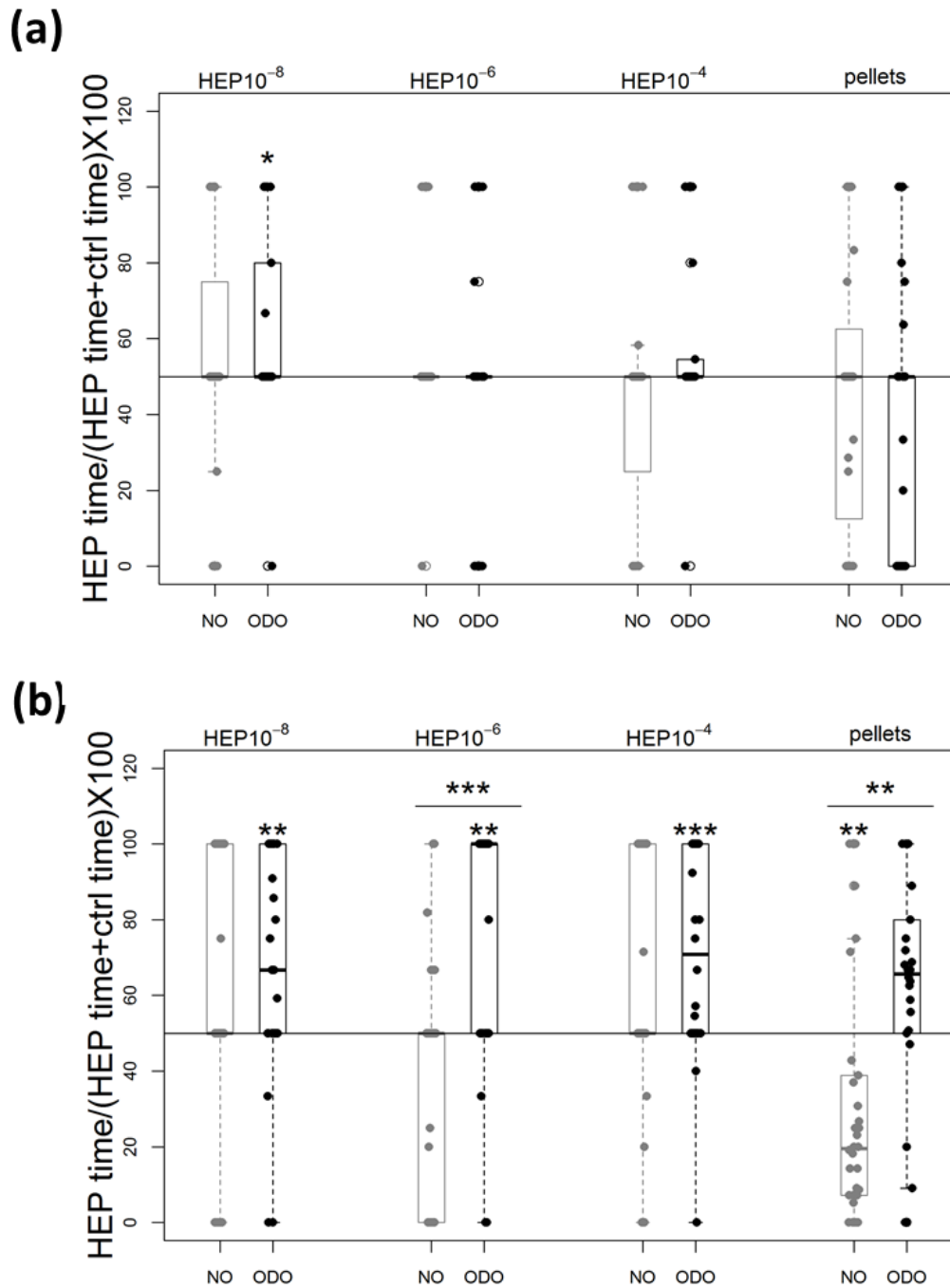
**Figure 1: Schematic representation of odour exposure and experimental procedures.**



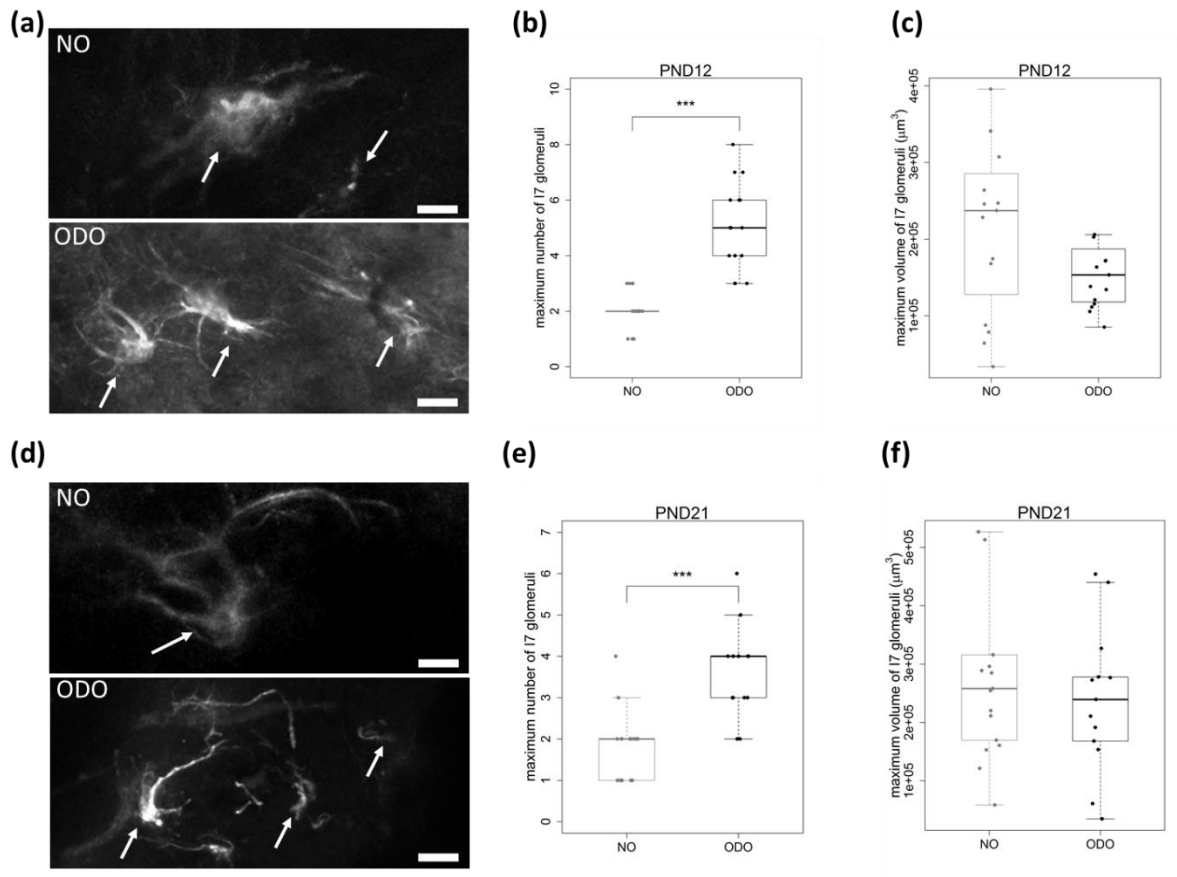
**Figure 2: GC-MS/MS analysis of heptaldehyde levels in the biological fluids collected from odorized and non-odorized samples.**



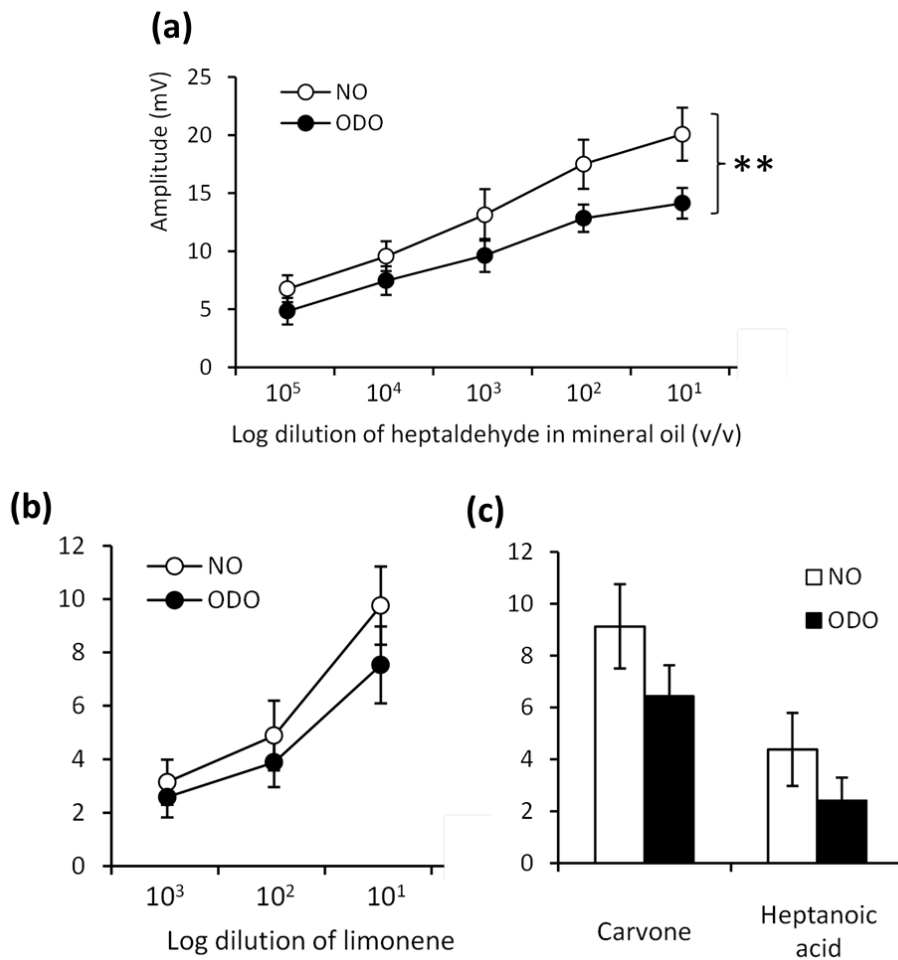
**Figure 3. Effect of HEP odour exposure on the sniffing activity in a 2-hole board test at PND14 (a) and PND21 (b).**



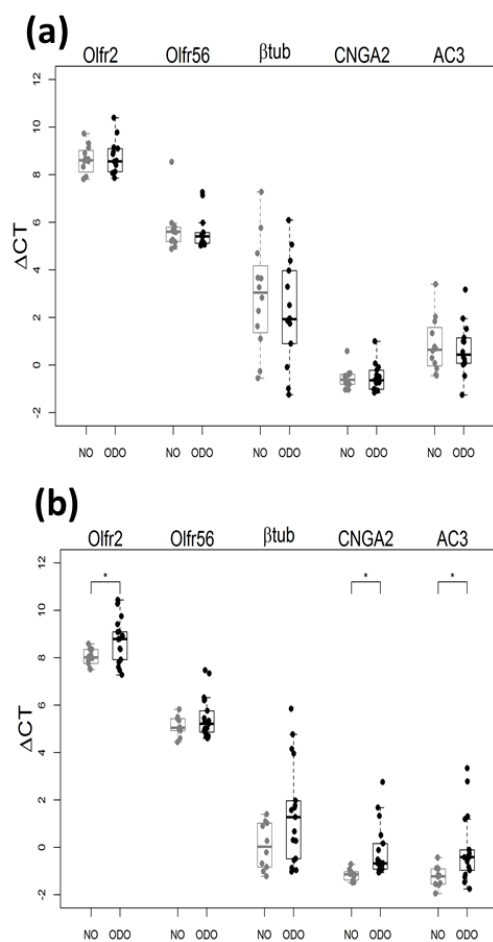
**Figure 4: Effect of odour exposure on OB structuration at PND12 (a to c) and PND21 (d to f).**



**Figure 5: Olfactory epithelium responses to odorants differ for HEP in the odorized group.**



**Figure 6: Effect of HEP exposure on the expression of olfactory-related genes in olfactory mucosa of pups at PND12 (a) and PND21 (b), respectively.**



**Table 1: Sequences of primers for real-time quantitative PCR.**

Abbreviation	Forward sequence	Reverse sequence	Fragment (bp)	Gene accession number
Suclg1	GCGTCATCAACCCTGGAGAA	CTGCCCAATCCGACTTG	140	NM_019879.3
olf2 (i7)	TCCTGATATCTAGCTCATGAACA	CACTCTCCAGTGTGGTTCC	166	NM_010983.2
olf56	GCGCTCTGTGGAAATGTCT	GTCCTAACAAAGAGACCCTCTGA	238	NM_010999.2
β-tub	TGAGGCCTCCTCTCACAAGT	GGCCTGAATAGGTGTCCAAA	105	NM_023279.2
ACIII	TTGACTCTCTCTGGACAATCC	CTTGTAAGCCATTGGTGTGA	118	NM_138305.3
CNGA2	GTGGAAGTGGTACTGAAGCTTCGT	TGACAGCAAGGCATACTGAGTCAC	153	NM_007724.3

## Figures Legends

### **Figure 1: Schematic representation of odour exposure and experimental procedures.**

Filled portions of the arrows indicate the period when the mother ate the odorised food. AF: amniotic fluid; GD: gestational day; NO: non odorized; ODO: odorized; PND: postnatal day.

### **Figure 2: GC-MS/MS analysis of heptaldehyde levels in the biological fluids collected from odorized and non-odorized samples.** (a): Amniotic fluid (AF) of mI7 fetuses at

GD14 (a, n=6 each), (b): PND3 (n=4 ODO and n=7 NO) and PND12 (n=5 ODO and n=7 NO) milks of CD1 mice. Grey scales represent NO scores, black scales represent ODO scores. \*p<0.05; \*\* p<0.01 (Two-Sample Fisher-Pitman Permutation Test). AF: amniotic fluid; NO: non odorized; ODO: odorized; PND: postnatal day.

### **Figure 3: Effect of HEP odour exposure on the sniffing activity in a 2-hole board test at PND14 (a) and PND21 (b).**

The percentage of time spent sniffing the HEP-filled hole compared to the total time spent sniffing is given for each of the successive 4 tests of 90 sec each (test 1:  $10^{-8}$  M HEP; test 2:  $10^{-6}$  M HEP; test 3:  $10^{-4}$  M HEP; test 4: odorized/non odorized food pellets) performed on non-odorized (n=34 pups from 5 litters) and odorized pups (n= 26 from 6 litters). Grey scales represent NO scores, black scales represent ODO scores. \*p<0.05; \*\* p<0.01; \*\*\*p<0.001 (t-test for lateralisation analysis and Two-Sample Fisher-Pitman Permutation Test for odorisation effect analysis). NO: non odorized; ODO: odorized; PND: postnatal day.

### **Figure 4: Effect of odour exposure on OB structuration at PND12 (a to c) and PND21 (d**

**to f).** (a, d): Cross-sections of representative GFP-tagged I7 glomeruli in OB from each NO (up) and ODO group (down) at PND12 (a) and PND21 (d). White arrows indicate the position

of each glomerulus. Maximum number (b and e) and volume (c and f, in  $\mu\text{m}^3$ ) of I7 glomeruli in NO and ODO groups at PND12 (b and c; n=15 pups each) and PND21 (e and f, n=17 NO pups and n=13 ODO pups). \* $p < 0.05$  (Two-Sample Fisher-Pitman Permutation Test). Grey scales represent NO scores, black scales represent ODO scores. NO: non odorized; ODO: odorized; PND: postnatal day. Scale bar= 50  $\mu\text{m}$ .

**Figure 5: Olfactory epithelium responses to odorants differ for HEP in the odorized group.** The global response of the olfactory sensory neurons from the 2 groups of mice was assessed by electroolfactogram (EOG) in response to increasing concentrations of heptaldehyde (a) or limonene (b) and to carvone/heptanoic acid (c). Values represent the mean of peak amplitude  $\pm$ SEM. \*\* $p < 0.01$  (Two-Sample Fisher-Pitman Permutation Test). n=6 pups each. NO: non odorized, white bars; ODO: odorized, black bars.

**Figure 6: Effect of HEP exposure on the expression of olfactory-related genes in olfactory mucosa of pups at PND12 (a) and PND21 (b), respectively.** Results are expressed as  $\Delta\text{Ct}$  relative to the Succinate-CoA ligase ADP-forming,  $\beta$  subunit (Suc1g) reference gene. Grey scales represent NO scores, black scales represent ODO scores. n=12 NO and n=14 ODO at PND12; n= 10 NO and n= 17 ODO at PND21; NO: non odorized; ODO: odorized; PND: postnatal day. \* $p < 0.05$  (Two-Sample Fisher-Pitman Permutation Test).

**Table 1:** Sequences of primers for real-time quantitative PCR.



# Chapitre III : Effets d'une exposition odorante périnatale à l'heptanal sur la modulation du stress au moment du sevrage

## I. Problématique posée

Comme nous l'avons abordé dans les chapitres précédents, la mère donne une signature olfactive qui lui est propre au niveau du liquide amniotique et du lait en partie grâce aux composés odorants présents dans son alimentation. Nous avons montré précédemment que l'ajout d'un composé odorant artificiel dans l'alimentation de la mère, ici l'heptanal, modifie les compositions odorantes du LA et du lait, auxquelles le petit se familiarise pendant la période périnatale, et peut être détecté par l'animal lors de tests de comportement au moment du sevrage. Comme nous l'avons décrit dans le chapitre III de l'Introduction, les odeurs maternelles, en particulier l'odeur du liquide amniotique et du lait maternel, peuvent avoir un effet apaisant chez le nouveau-né humain lorsqu'il est soumis à un stress (séparation maternelle, prélèvement sanguin). Nous avons émis l'hypothèse que l'heptanal rencontré par l'animal dans sa période périnatale pouvait constituer une représentation simplifiée de la signature maternelle complexe, et être considéré par l'animal comme molécule apaisante dans des phases stressantes rencontrées par l'animal. Notre hypothèse était que l'état de stress des animaux issus de mères odorisées via leur alimentation, soumis à un stress en présence de l'odorant avec lequel ils sont familiers de par leur environnement périnatal, pourrait être diminué, comme cela a été montré dans une étude menée chez le porc (Oostinjer et al, 2011). Nous avons choisi de mesurer l'effet de l'exposition odorante sur une phase délicate de la vie de l'animal, le moment du sevrage, où la séparation maternelle (SM) concomitante à une transition alimentaire, est un challenge particulièrement stressant. Chez les mammifères, il a été montré que les soins apportés par la mère à ses petits après la naissance, incluant aussi bien les contacts physiques que la nutrition, ont un rôle majeur, d'un point de vue comportemental, endocrinien et neurologique chez les petits. Ainsi, chez le rongeur, une séparation maternelle quotidienne de plusieurs heures pendant les 20 premiers jours de vie peut avoir de graves conséquences sur les petits à l'âge adulte, incluant une augmentation des comportements d'anxiété (Caldji et al, 2004 ; Liu et al, 2000) et des réponses endocriniennes aux facteurs de stress (Ladd et al, 1996). Ces effets ont également été décrits lors d'un sevrage précoce chez le rongeur (Kanari et al, 2005 ; Kikusui et al, 2006). La séparation maternelle

lors du sevrage est donc considérée comme une situation stressante pour l'animal. Il a ainsi été montré que le sevrage induit chez le souriceau une augmentation du taux de corticostérone dans les 48h suivant le sevrage (Wurbel et Stauffacher, 1997). Nous avons donc décidé d'utiliser la séparation maternelle du sevrage comme agent stressant à appliquer aux souriceaux CD1, que nous avons réalisé en présence ou absence d'heptanal.

Pour évaluer l'effet de l'exposition odorante sur la réaction au stress des souriceaux, nous avons choisi de mettre en place un test dit en open-field (ou test en champ ouvert) (OPF). L'OPF est utilisé pour mesurer le niveau de stress ainsi que la volonté d'explorer un environnement nouveau, en quantifiant l'activité exploratoire et comportementale (locomotion, thigmotaxie, toilettage, défécations). Hall a d'abord décrit ce test pour l'étude de l'émotivité chez le rat (Hall, 1934). Ce test est l'un des plus populaires en psychologie animale (Belzung, 1999). La procédure consiste à soumettre un animal à un environnement inconnu dont la fuite est empêchée par les parois environnantes. L'animal est placé au centre ou à proximité des parois de l'enceinte et l'élément comportemental principal enregistré pendant une période de 2 à 20 min est la locomotion horizontale. Dans une telle situation, les rongeurs préfèrent spontanément la périphérie de l'enceinte et leur activité dans les parties centrales de l'OPF est limitée. L'augmentation du temps passé dans la partie centrale est une indication d'anxiolyse (Prut et Belzung, 2003). L'OPF sert ici d'outil de mesure pour évaluer l'état de stress des souriceaux.

Une seule étude menée chez le porc a montré une diminution du stress au moment du sevrage en présence d'un composé odorant chez des porcelets ayant été exposés à ce même composé odorant via l'alimentation périnatale (Oostinjer et al, 2011). Ainsi, des porcelets ayant été exposés à l'anis via l'alimentation de leur mère pendant les périodes de fin de gestation et de lactation ont montré, après le sevrage, davantage de comportements de jeux et moins de comportements agressifs en présence de l'odeur d'anis, que des porcelets n'ayant pas été pré-exposés, reflétant un état de stress diminué. Et ces résultats comportementaux ont été confirmés d'un point de vue biochimique, avec un dosage du taux de cortisol salivaire, qui a été retrouvé en plus faible quantité 4h et 7h après le sevrage, chez les porcelets ayant été exposés. Nous avons donc décidé d'explorer la relation exposition odorante périnatale et stress sur le modèle d'exposition odorante à l'heptanal via l'alimentation chez la souris.

## II. Matériel et méthodes

### A. Choix du modèle expérimental

Avec la mise au point du modèle de souris *mI7-GFP* adopté par des mères CD1, nous sommes confrontés à différents aléas liés au protocole d'adoption. Notamment, il arrive que des femelles CD1 gestantes soient en surnombre, car elles mettent bas trop tôt ou trop tard pour adopter des souriceaux *mI7-GFP* ou que les souris *mI7-GFP* s'avèrent finalement non gestantes malgré la présence de bouchon vaginal. Nous avons donc, pour des raisons d'éthique, décidé de ne pas éliminer les portées de ces femelles surnuméraires et de conduire cette étude pour regarder les effets de l'exposition odorante périnatale sur le stress de séparation maternelle.

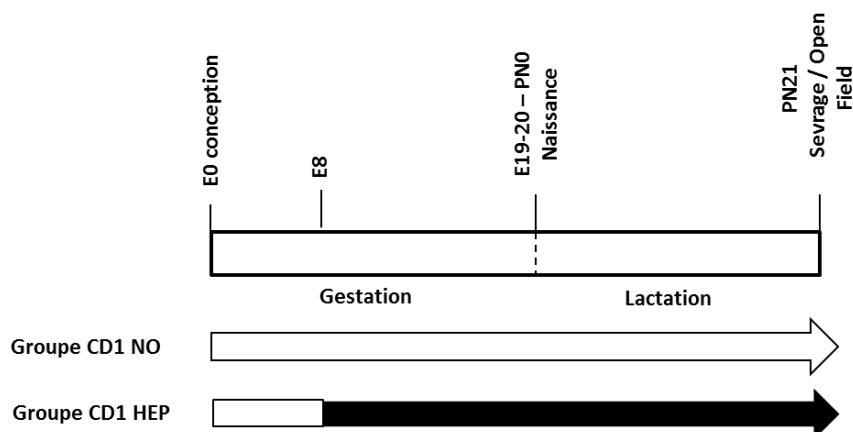
De plus, la taille des portées de petits CD1 étant importante ( $\geq 10$  souriceaux en moyenne), l'expérimentation sur ces animaux permet également de disposer d'effectifs importants.

Enfin, une étude a montré que les souris de la lignée CD1 ont une sensibilité olfactive bien développée pour les aldéhydes (Laska et al, 2006). Elles sont donc capables de percevoir l'heptanal à de faibles concentrations.

### B. Conditions d'odorisation des mères CD1 à l'heptanal par l'alimentation

Les conditions d'élevage, d'accouplement, de préparation des croquettes sont les mêmes que celles décrites dans le chapitre I de la partie Résultats.

A partir de E8, 2 groupes de femelles gestantes sont constitués. Un groupe reçoit de la nourriture contrôle non odorisé (groupe NO) et l'autre groupe reçoit de la nourriture odorisée à l'heptanal 10% (groupe HEP), jusqu'au sevrage des souriceaux (**Figure 48**). A la naissance, les portées sont équilibrées à n=10 souriceaux de manière à limiter les effets « taille de portée » sur les données métaboliques.



**Figure 48** : Plan d’odorisation et expériences effectuées sur les souriceaux CD1 issus des 2 groupes NO et HEP – la partie pleine des flèches indique la période pendant laquelle les mères ont consommé des croquettes odorisées à l’heptanal 10%.

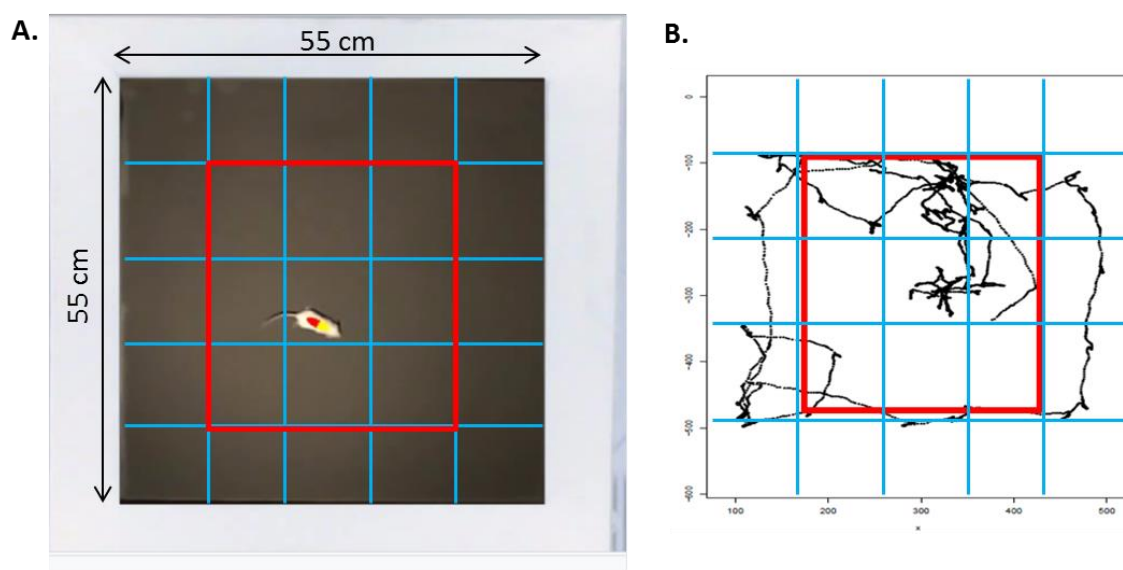
Des souriceaux à PN21 nés de mères non odorisées (NO) ou odorisées (HEP) sont séparés de leur mère 4 heures avant le test en isolant chaque souriceau dans une cage individuelle sans litière, sans nourriture et sans eau, dans une pièce non odorisée ou odorisée avec l’heptanal (40  $\mu$ L à 10% sur 8 papiers filtre répartis dans la pièce et changés régulièrement, après 2 passages d’animaux). Des groupes distincts sont définis selon l’exposition odorante maternelle des souriceaux (NO ou HEP, 1<sup>er</sup> terme) et selon la pièce de séparation dans laquelle les souriceaux sont isolés (NO ou HEP, 2<sup>nd</sup> terme), ce qui donne 4 groupes : NO/NO ; NO/HEP ; HEP/NO et HEP/HEP. Les animaux sont ensuite placés dans le dispositif expérimental d’OPF : une boîte carrée de 55 x 55 x 35 cm en plastique noir mat (**Figure 49 A.**), disposée dans une pièce éclairée et fermée. Ils sont positionnés un à un au centre de l’OPF et sont laissés pendant 5 minutes, en absence de manipulateur. Une caméra placée au-dessus de la boîte enregistre leurs parcours, les données sont récupérées pour permettre le calcul ultérieur du comportement locomoteur en terme de distance parcourue.

Une première série de tests OPF a été réalisée dans une pièce non odorisée (Open field non odorisé OPF NO). Puis une autre série de tests a été réalisée dans une pièce odorisée par de l’heptanal dans les mêmes conditions que dans la pièce de séparation maternelle (Open field odorisé OPF HEP). Entre chaque animal, le dispositif d’OPF est nettoyé à l’eau. A chaque étape, les souriceaux sont manipulés par la queue.

### C. Traitement des données

Un fois récupérée, la vidéo est convertie en « avi. » pour être lue par le logiciel « Mice-Tracking » conçu au laboratoire par Karine Badonnel (IR, INRA). Son principe repose sur l'utilisation d'un curseur qui enregistre la position du souriceau dans l'OPF, à partir de la vidéo convertie en « avi. » pour être lue par le logiciel. Ensuite, le fond de la vidéo (sauf OPF) est soustrait et apparaît en filigrane (**Figure 49**). En faisant cela, le seul élément mobile de la vidéo restant est le souriceau. Sa position peut donc être suivie. Le logiciel est programmé en définissant: 1) le temps de lecture : durée pendant laquelle la position de la souris est enregistrée (5 minutes), 2) le cadre de lecture : zone dans laquelle le curseur va se déplacer, 3) une zone interne et une zone externe. La zone interne représente l'intérieur d'un carré dont le côté mesure 2/3 de la diagonale de l'OPF (**Figure 49**). La zone extérieure à ce carré constitue la zone externe.

Les coordonnées de la souris sont enregistrées dans un fichier « .csv » et les paramètres d'intérêts : distance parcourue (en pixels) et temps passé dans la zone interne (en secondes) sont calculés sous programmation R.



**Figure 49** : Tests open-field – souris CD1 - **A.** Schéma représentatif de l'enceinte OPF utilisée pour les tests – taille de l'enceinte = 55cm x 55 cm – le carré central délimité en rouge correspond à la zone interne, le couloir entourant cette zone, à la périphérie de l'enceinte, est considéré comme la zone externe – au centre : souriceau CD1 soumis au test - tracking enregistrant ses coordonnées tête / queue (marque jaune / rouge) – **B.** Résultats obtenus avec un souriceau HEP grâce au logiciel de tracking mis au point au laboratoire – zone centrale représentée par le carré rouge – la trace en noir correspond au trajet effectué par le souriceau pendant les 5 min d'enregistrement.

### III. Résultats

Deux séries expérimentales ont été conduites : l'une a été réalisée dans une pièce non odorisée (OPF NO) et l'autre dans une pièce odorisée par de l'heptanal dans les mêmes conditions que dans la pièce de séparation (OPF HEP).

#### A. OPF réalisé en absence d'heptanal (OPF NO)

54 souriceaux du groupe NO (27 souriceaux NO\_NO, ♂ : 56% et 27 souriceaux NO\_HEP, ♂ : 48%) issus de 5 portées et 50 souriceaux du groupe HEP (24 souriceaux HEP\_NO, ♂ : 46% et 26 souriceaux HEP\_HEP, ♂ : 50%) issus de 5 portées ont été testés sur trois séries d'expériences, réparties sur trois jours différents. Nous avons dans un premier temps effectué une étude statistique des résultats afin d'étudier les potentielles interactions qu'il pourrait y avoir entre les paramètres mesurés et le sexe de l'animal et le jour de l'expérience (ANOVA sous R). Aucun effet lié au sexe n'ayant été identifié, les données rassemblent mâles et femelles. Et aucun effet lié à la mère et au jour de l'expérience n'ont été identifiés, nous avons regroupé les données obtenues pour chacun des groupes et effectuer des comparaisons entre les 4 groupes. Les résultats sont présentés dans la **Figure 50**.

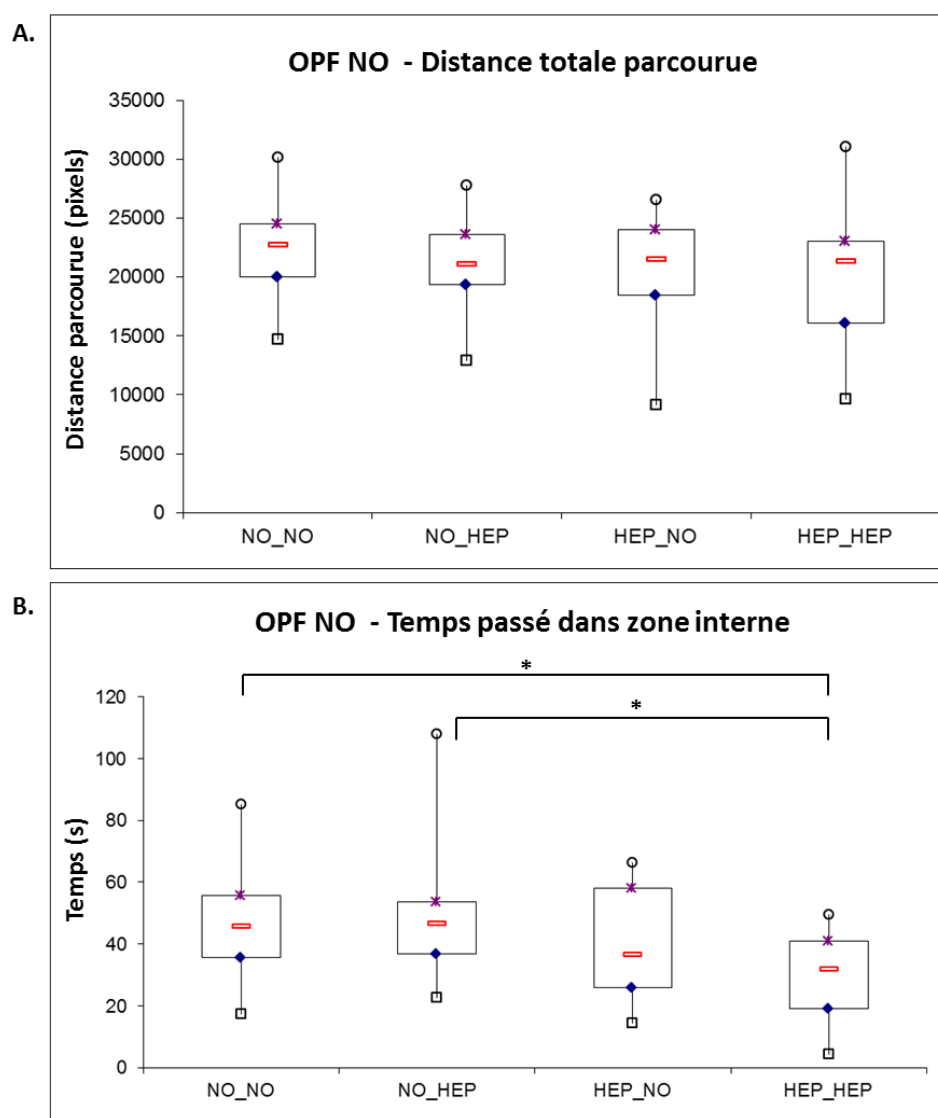
##### 1) Effet sur la distance totale parcourue

Le logiciel Mice-Tracking a permis de calculer la distance totale parcourue par les animaux au cours des 5 minutes dans l'OPF (distance exprimée en pixels). L'analyse statistique des résultats obtenus pour les distances totales parcourues par les souriceaux des 4 groupes pendant les 5 min d'enregistrement n'a pas révélé de différence significative entre les 4 groupes (**Figure 50 A.**) (Test Asymptotic Kruskal-Wallis) (valeurs médianes : 22671 pixels groupe NO\_NO, 21090 pixels groupe NO\_HEP, 21443 pixels groupe HEP\_NO et 21332 pixels groupe HEP\_HEP). Les souriceaux, quels que soient leur statut maternel et leur condition d'odorisation avant le test et pendant la séparation, se déplacent de façon équivalente.

##### 2) Effet sur le temps passé en zone interne

Pour ce qui est du temps passé dans la zone interne, l'analyse statistique intra-groupe montre que les animaux nés de mère NO et de mère HEP passent un temps équivalent en zone

interne quelle que soit la condition d'odorisation lors de la séparation maternelle (**Figure 50 B.**) (Test Asymptotic Kruskal-Wallis) (valeurs médianes : 46s groupe NO\_NO, 47s groupe NO\_HEP, 37s groupe HEP\_NO et 32s groupe HEP\_HEP). Il n'y a donc pas d'effet de la présence d'heptanal pendant la MS sur le temps passé en zone interne de chacun des 2 groupes dans l'OPF non odorisé.



**Figure 50** : OPF NO - **A.** Graphique en boxplot - Comparaison des distances totales parcourues par les souriceaux CD1 des 4 groupes expérimentaux – **B.** Graphique en boxplot - comparaison des temps passés dans la zone interne par les souriceaux CD1 des 4 groupes expérimentaux (Test Asymptotic Kruskal-Wallis).

Lorsque l'on compare les groupes entre eux, on constate que les souriceaux du groupe HEP\_HEP passent significativement moins de temps dans la zone interne que les souriceaux du groupe NO\_NO et les souriceaux du groupe NO\_HEP (Test Asymptotic Kruskal-Wallis,  $p=0,0481$  et  $p=0,0163$ , respectivement), mais ne sont pas statistiquement différents des animaux du groupe HEP\_NO. Ces résultats suggèrent les souriceaux pré-exposés à l'heptanal manifestent un comportement de stress marqué lorsqu'ils sont soumis au test OPF en l'absence de l'heptanal, comparé à des souriceaux non pré-exposés. Notre hypothèse est que le stress révélé par l'OPF NO chez les animaux nés de mère odorisée et eux-mêmes odorisés pendant la séparation était lié à la « perte » de repère olfactif dans l'environnement des animaux lors de l'OPF en condition non odorisée. Pour vérifier cette hypothèse, nous avons donc réalisé une seconde série de tests, dans les mêmes conditions que la première série mais en testant les animaux dans un OPF en condition odorisée.

## **B. OPF réalisé en présence d'heptanal (OPF HEP)**

30 souriceaux âgés de 21 jours du groupe NO (15 souriceaux NO\_NO, ♂ : 47% et 15 souriceaux NO\_HEP, ♂ : 47%) issus de 5 portées et 21 souriceaux du groupe HEP (11 souriceaux HEP\_NO, ♂ : 45% et 10 souriceaux HEP\_HEP, ♂ : 60%) issus 6 portées ont été testés sur trois séries d'expériences d'OPF HEP, réparties sur trois jours différents et réalisées dans les mêmes conditions que les séries d'OPF NO, mais dans une pièce en présence d'heptanal. Nous avons dans un premier temps étudié les interactions entre les paramètres mesurés (distance totale parcourue et temps passé dans la zone interne) et le sexe de l'animal et le jour de l'expérience (ANOVA sous R). Nous n'avons trouvé aucun effet lié au sexe. Les données rassemblent donc mâles et femelles. En revanche, une interaction entre la distance parcourue et la date de l'expérience a été mise en évidence ( $p=0,009$ ). Nous avons donc étudié ce paramètre de façon indépendante pour chaque jour d'expérience (jour 1 à 3). Les résultats obtenus sont représentés en **Figure 51**.

### **1) Effet sur la distance totale parcourue**

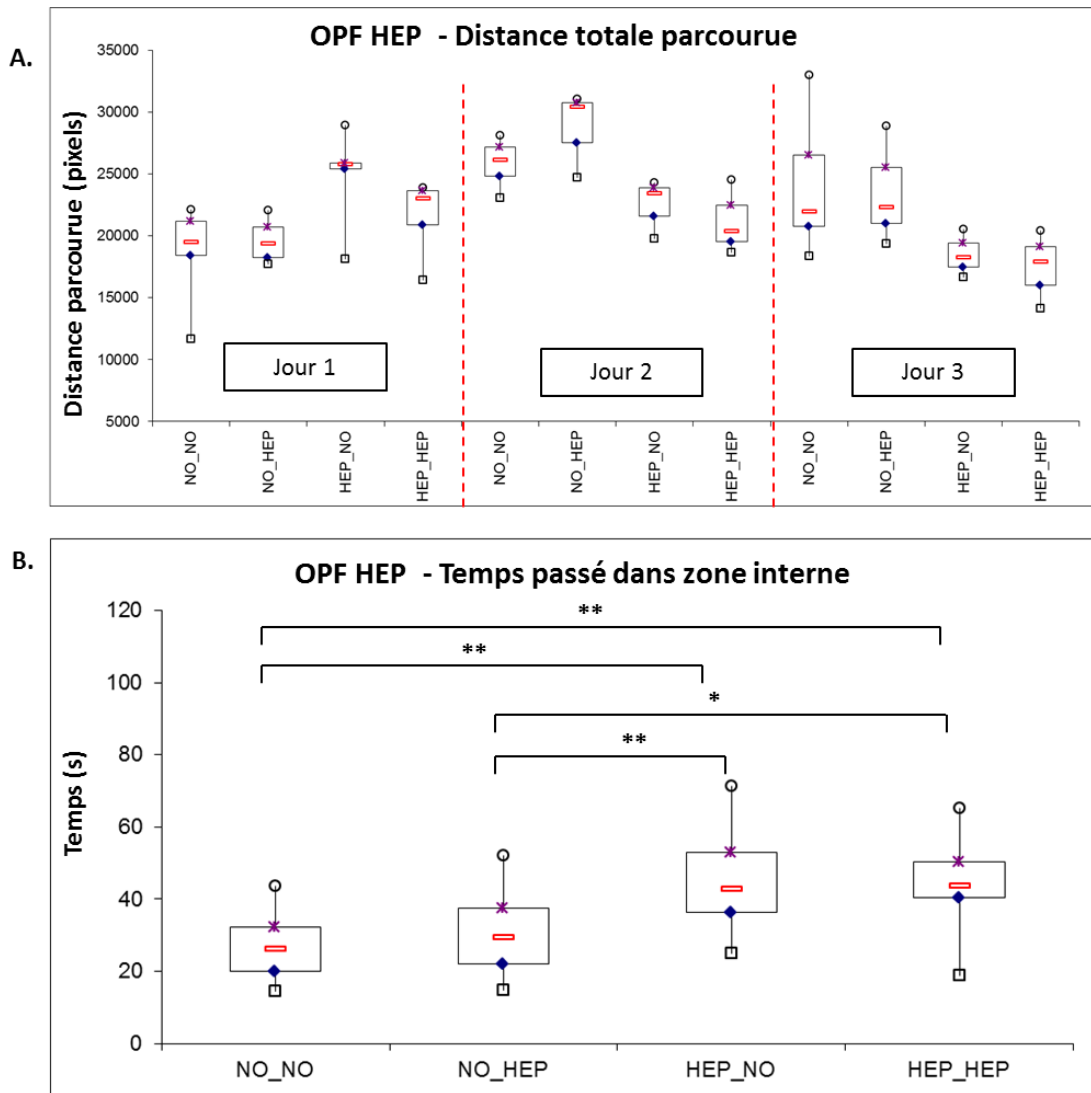
Nous n'avons observé aucune différence significative entre les distances totales parcourues par les souriceaux des 4 groupes testés le même jour (**Figure 51 A.**) (Test Asymptotic Kruskal-Wallis) (valeurs médianes : jour expérience 1 : 19452 pixels groupe NO\_NO, 19348 pixels groupe NO\_HEP, 25737 pixels groupe HEP\_NO et 22993 pixels groupe HEP\_HEP ; jour d'expérience 2 : 26130 pixels groupe NO\_NO, 30387 pixels groupe



NO\_HEP, 20359 pixels groupe HEP\_NO et 21910 pixels groupe HEP\_HEP ; jour d'expérience 3 :,21910 pixels groupe NO\_NO, 22281 pixels groupe NO\_HEP, 18241 pixels groupe HEP\_NO et 17865 pixels groupe HEP\_HEP). Bien que les distances totales parcourues varient d'un jour d'expérience à l'autre, les souriceaux, quels que soient leur statut maternel et leur condition d'odorisation avant le test et pendant la séparation, se déplacent de façon équivalente pour un même jour d'expérience. Le statut d'odorisation des animaux ne semble pas jouer sur leur niveau de locomotion dans l'OPF.

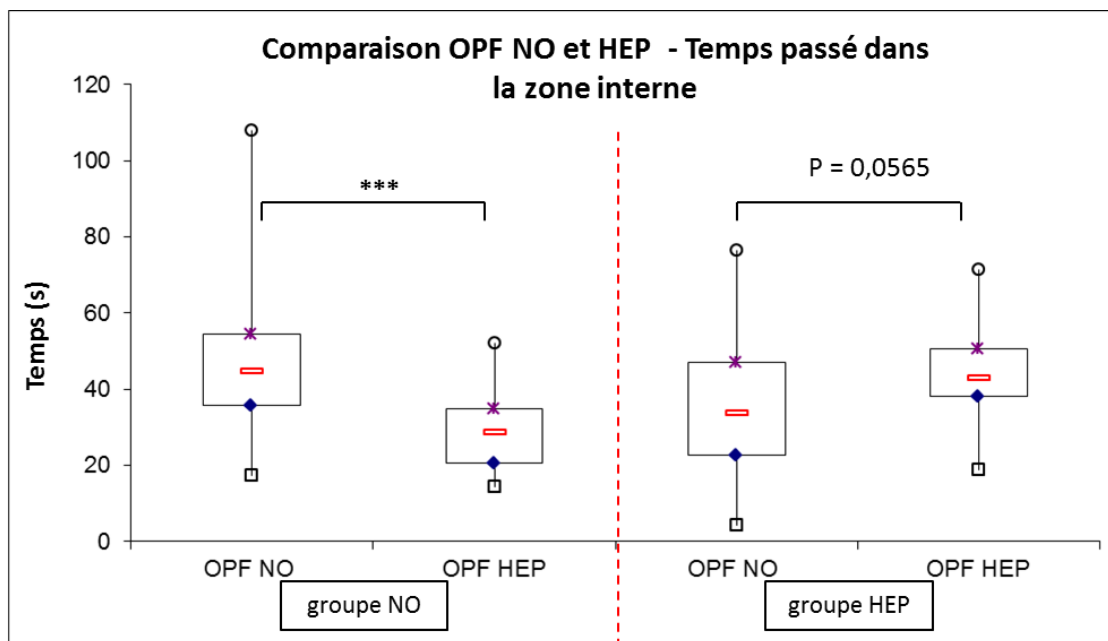
## 2) Effet sur le temps passé en zone interne

Pour ce qui est du temps passé dans la zone interne, aucune interaction n'a été mise en évidence entre le temps passé dans la zone interne et le jour de l'expérience, nous avons donc regroupé les données du temps passé dans la zone interne des trois expériences (**Figure 51 B.**) A nouveau, nous observons que la condition dans laquelle la séparation maternelle s'est déroulée n'influence pas le temps passé dans la zone interne du dispositif pour un même groupe d'animaux. En revanche, les souriceaux nés de mères odorisées passent significativement plus de temps dans la zone interne que les souriceaux nés de mères NO, quel que soit leur statut au moment de la séparation maternelle (Test Asymptotic Kruskal-Wallis – HEP\_NO vs NO\_NO :  $p=0,001$  ; et HEP\_NO vs NO\_HEP :  $p=0,006$  ; HEP\_HEP vs NO\_NO :  $0,0022$  ; HEP\_HEP vs NO\_HEP :  $0,0213$ ) (valeurs médianes : 26s groupe NO\_NO, 29s groupe NO\_HEP, 43s HEP\_NO et 44s groupe HEP\_HEP). Nous pouvons conclure que les animaux HEP, passant plus de temps au centre du dispositif, seraient moins stressés en présence de l'odeur d'heptanal que les animaux NO.



**Figure 51 :** OPF HEP - **A.** Graphique en boxplot - comparaison des distances totales parcourues par les souriceaux CD1 des 4 groupes expérimentaux pour chacun des 3 jours d'expérience – **B.** Graphique en boxplot - comparaison des temps passés dans la zone interne par les souriceaux CD1 des 4 groupes expérimentaux (Test Asymptotic Kruskal-Wallis - \* :  $p < 0,05$  ; \*\* :  $p < 0,01$ ).

Dans la mesure où les résultats des OPF odorisés et non odorisés indiquent clairement que la condition dans laquelle la séparation maternelle s'est déroulée n'influence pas le temps passé en zone interne des animaux, nous avons regroupé les sous-groupes selon le statut maternel et comparé les résultats obtenus dans les deux OPF (**Figure 52**).



**Figure 52 :** Comparaison OPF NO / OPF HEP - Graphique en boxplot - Comparaison des temps passés dans la zone interne par les souriceaux CD1 des groupes NO et HEP lors des tests OPF en absence d'heptanal (OPF NO) et en présence d'heptanal (OPF HEP) (groupe NO : T-test 2 échantillons, \*\*\* $<0,001$  ; groupe HEP : test non paramétrique de permutation, non significatif,  $p=0,0565$ ).

Ces résultats montrent que les animaux issus de mère NO passent significativement moins de temps dans la zone interne de l'OPF HEP par rapport à celle de l'OPF NO (valeurs médianes : 45s NO dans OPF NO et 29s pour NO dans OPF HEP) (T-test 2 échantillons –  $n>30$  pour les 2 groupes comparés -  $p=4,6.10^{-8}$ ). A noter que les valeurs obtenues pour le groupe NO dans l'OPF NO sont très hétérogènes, allant de 17 à 108s. La présence d'heptanal dans l'environnement des souriceaux issus de mères NO semble donc induire chez eux un comportement aversif, conduisant à une augmentation de leur état de stress lorsqu'ils sont placés dans un lieu inconnu tel que l'OPF. A l'inverse, une tendance pour les animaux issus de mère HEP à passer plus de temps dans la zone interne dans l'OPF HEP qu'en OPF NO est aussi observée (valeurs médianes : 34s groupe HEP dans OPF NO et 43s groupe HEP dans OPF HEP) (non significatif – test non paramétrique de permutation -  $n<30$  pour le groupe HEP dans l'OPF HEP -  $p=0,0565$ ). Enfin, le temps passé dans la zone interne par les souriceaux NO dans l'OPF non odorisé n'est significativement pas différent de celui des souriceaux HEP dans l'OPF odorisé (valeurs médianes : 45s NO dans OPF NO et 43s groupe HEP dans OPF HEP) (test de permutation –  $n<30$  pour le groupe HEP dans l'OPF HEP).

Ces résultats suggèrent donc que les souriceaux issus de mères non odorisées montrent un comportement aversif envers l'heptanal, qui se traduit par une augmentation de leur état de stress en sa présence. A l'inverse, la présence d'heptanal dans l'environnement des souriceaux ayant été familiarisés avec cet odorant pendant la période périnatale n'induit pas d'augmentation de leur état de stress. L'exposition périnatale à l'heptanal permettrait donc une levée de l'aversion pour l'heptanal chez les animaux préexposés.

## Discussion et perspectives

Nos résultats démontrent qu'une exposition périnatale chronique à l'heptanal via l'alimentation de la mère impacte le comportement médié par l'olfaction des souriceaux *mI7-GFP* odorisés avant le sevrage, en affectant la réponse comportementale à l'heptanal mesurée par des tests olfactifs et de réponse au stress. Cet effet comportemental est associé à une plasticité neuronale retrouvée aux deux niveaux du système olfactif principal : la MO et le BO. Différentes études ont étudié les effets d'une exposition odorante périnatale sur la sensibilité de la MO, la structuration des glomérules du BO et certains comportements associés chez les souriceaux de différentes lignées transgéniques, avec divers odorants. Aucune n'avait encore combiné ces différentes analyses pour une lignée murine donnée, avec un odorant spécifique, dans une même étude. De même, aucune étude n'avait jusqu'ici analysé les effets d'une telle exposition odorante sur la modulation du stress chez la souris. Nous avons confirmé donc que l'expérience sensorielle olfactive rencontrée par l'animal pendant la période de développement périnatale induit clairement des modifications au niveau du système olfactif, qui se construit différemment au niveau du BO avec une augmentation du nombre de glomérules, une diminution de la sensibilité générale de la MO vis-à-vis de l'heptanal, mais n'affecte que légèrement l'homéostasie de la MO.

### **I. Démonstration de la présence de l'heptanal dans les fluides biologiques maternel**

Les résultats obtenus en GC-MS-MS nous ont permis de valider la présence d'heptanal dans les liquides amniotiques et laits des souris *mI7-GFP* et CD1 ayant consommé des croquettes odorisées à l'heptanal 10%. Cette validation était importante, car nous n'avions pas la certitude que l'heptanal pouvait franchir les barrières biologiques (placenta et lait), ceci n'ayant jamais été caractérisé. La plupart des études antérieures ayant procédé à des expositions odorantes ont utilisé des panels de juges entraînés pour détecter la présence d'un composé odorant dans du liquide amniotique humain (Hauser et al, 1985 ; Mennella et al, 1995 ; Nolte et al, 1992) ou du lait maternel (Mennella et Beauchamp, 1991a ; 1991b et 1999) comme la vanille, le cumin, etc... (Cf Introduction chapitre II). Dans leur étude, Logan et ses collaborateurs ont quant à eux utilisé la technique de spectrométrie de masse pour comparer les profils odorants de liquides amniotiques issus de souris ayant consommé ou non une

boisson odorisée à l'ail ou à la vanilline. Seule une étude récente a utilisé la technique de GC-MS pour identifier les composés chimiques présents dans le liquide amniotique responsable de l'attraction des nouveau-nés pour ce fluide (Sreng et al, 2016). Les auteurs ont également vérifié que l'ajout d'un composé odorant dans l'alimentation de la mère modifiait le comportement olfactif des souriceaux vis-à-vis de ce composé odorant, néanmoins, les auteurs n'ont pas analysé par GC-MS les liquides amniotiques issus de ces femelles. Quelques études ont utilisé cette technique pour mettre en évidence la présence d'un composé odorant dans le lait (Désage et al, 1996 ; Hausner et al, 2008 ; Kirsh et al, 2012 et 2013). Dans une autre étude récente, les auteurs ont couplé la technique de GC-MS à l'olfactométrie pour analyser la composition chimique de laits issus de mères ayant consommé de l'ail (Scheffler et al, 2016). A notre connaissance, cette étude est donc la première à avoir utilisé la technique de GC-MS/MS pour valider la présence d'un composé odorant dans les fluides maternels après odorisation. Cette validation nous a permis de nous assurer que les souriceaux allaient bien être exposés à l'heptanal pendant toute la période périnatale, via le liquide amniotique *in utero* et via le lait maternel *ex utero*.

## **II. Effets comportementaux induits par une exposition périnatale à l'heptanal**

### **A. Effets sur le comportement de préférence à l'heptanal**

Plusieurs études ayant analysé les effets comportementaux suite à une exposition odorante pendant la période de gestation ont conclu à des effets positifs sur l'orientation physique des animaux les jours suivants la naissance chez plusieurs espèces (Becques et al, 2009 ; Coureaud et al, 2001 ; Hepper et al, 2012 ; Schaal et al, 2000 ; Hepper et Wells, 2005). Dans cette étude, nous avons montré qu'une exposition périnatale à l'heptanal conduit au développement de préférences guidées par l'heptanal chez des souriceaux *mI7-GFP*, avant le sevrage, induisant une augmentation du temps d'exploration de l'heptanal lorsqu'il est présenté seul. Cet effet n'a pas été retrouvé lorsque l'heptanal est présenté dans une croquette, contrairement aux résultats obtenus précédemment avec les lignées de souris M71 et M72, sur des souriceaux du même âge après une exposition odorante postnatale à d'autres odorants (PN0 à PN20) (Liu A et al, 2016 ; Todrank et al, 2011). Les effets comportementaux mis en évidence dans le modèle murin *mI7-GFP* s'apparentent donc davantage à ceux induits par une exposition odorante prénatale, laissant supposer que l'exposition pendant la période de gestation aurait prédominé dans l'orientation des préférences olfactives des souriceaux avant le sevrage par rapport à l'exposition post-natale. De façon surprenante, alors que les

souriceaux issus de mères odorisés ne montrent de préférence olfactive pour aucune des 2 croquettes, il semblerait que la croquette associée à l'heptanal ait déclenché un comportement aversif chez les souriceaux issus de mères non odorisées, qui montrent une préférence olfactive significative pour la croquette non odorisée, bien qu'ils n'aient pas manifesté d'aversion particulière à la présentation de l'odorant seul. Deux études menées chez l'humain ont montré qu'une exposition odorante prénatale avec un composé odorant connu pour être aversif pourrait agir sur l'acceptabilité de cet odorant chez des individus odorisés par rapport à des individus non familiers à cet odorant (Hepper, 1995 ; Schaal et al, 2000). Bien que l'heptanal soit perçu comme une odeur neutre, ni attractif, ni aversif par la souris (Saraiva et al, 2016), il se pourrait qu'il devienne aversif pour des animaux non familiers à l'odeur, lorsqu'il est présenté à de fortes concentrations comme c'est le cas avec la croquette (imprégnation avec de l'heptanal 10%). Ceci expliquerait également pourquoi nous n'avons pas observé ce comportement d'aversion chez les souriceaux issus de mères non odorisées lorsque l'heptanal était présenté seul à des concentrations plus faibles ( $10^{-8}$  à  $10^{-4}$  M). L'exposition périnatale à l'heptanal aurait pu induire une levée d'une aversion pour l'heptanal, présenté à des concentrations fortes, chez les souriceaux issus de mères odorisées. De plus, l'heptanal en mélange avec les autres signaux sensoriels présents dans la croquette pourrait perdre sa valeur attractive pour le souriceau préalablement exposé, qui montre une préférence nette pour l'heptanal seul à des concentrations faibles, mais pas de préférence une fois mélangé à la nourriture (Saraiva et al, 2016). Cet effet contrasté n'a pas été observé sur les autres études de choix vis à vis d'un aliment. Les équipes de Todrank et de Liu, en proposant aux souriceaux un choix entre deux croquettes odorisées, l'une avec l'odorant utilisé pendant l'exposition périnatale et l'autre avec un odorant non familier, ont probablement renforcé le contraste expérimental et augmenté l'attraction des souriceaux pour l'odeur familière, malgré que les croquettes aient été également imprégnées avec des concentrations fortes en odorant (1 ml d'odorant pur pour 100 g de croquettes) (Liu A et al, 2016 ; Todrank et al, 2011).

Nous avons observé que les animaux odorisés étaient capables de détecter une concentration faible d'heptanal dès PN14. Bien que les capacités de détection olfactive des souriceaux vis-à-vis de l'heptanal, suite à une exposition périnatale avec cet odorant, semblent amplifiées à l'âge du sevrage, nous avons pu observer que la sensibilité générale de la MO de ces souriceaux vis-à-vis de l'heptanal est quant à elle diminuée. Et cette baisse de la sensibilité de la MO est spécifique à l'heptanal puisqu'elle n'a pas été observée avec un odorant contrôle, le limonène ou la L-Carvone. Cette situation peut sembler paradoxale, mais

il faut rappeler que le test de la planche à trou ne mesure pas seulement le seuil de sensibilité olfactive périphérique, mais aussi le niveau d'intérêt de l'animal pour ce qu'il a senti.

## **B. Effets sur le comportement de stress**

Dans cette étude, nous avons montré que les animaux CD1 sont sensibles à leur environnement odorant selon leur statut d'odorisation : si les souriceaux issus de mères non odorisées sont plus stressés dans l'OPF en présence d'heptanal (OPF HEP), l'exposition périnatale à l'heptanal permet de diminuer l'état de stress des souriceaux CD1 au sevrage lorsqu'ils sont testés dans un milieu stressant (OPF) en présence d'heptanal dans l'environnement. Si nous extrapolons les résultats comportementaux, structuraux et moléculaires obtenus sur les souriceaux *mI7-GFP* à ceux de l'étude menée sur les souriceaux CD1, nous pouvons faire l'hypothèse que, si les souriceaux CD1, au sevrage, détectent l'heptanal dans le milieu environnemental avec une sensibilité périphérique comparable quelle que soit leur origine (réponse heptanal, EOG, RT-PCR), les souriceaux issus de mère non odorisées auraient une aversion pour l'heptanal (à forte concentration dans la croquette odorisée) absente chez les animaux issus de mères odorisés. Il se peut donc que les effets observés dans l'OPF en présence d'heptanal soient en partie liés à un effet aversif de l'odorant. Cependant, contrairement à notre hypothèse de départ, sa présence pendant la phase de séparation maternelle préalable ne semble pas influencer le niveau de stress ultérieur des animaux, y compris les souriceaux issus de mères non odorisées. Il serait intéressant de suivre les animaux pendant les 4h de séparation maternelle pour vérifier cette hypothèse.

Comme cela a été montré chez l'humain, les odeurs maternelles, telles que l'odeur du liquide amniotique ou du lait, peuvent induire une diminution de l'état de stress du nouveau-né, mesuré par une diminution des pleurs ([Badiee et al, 2013](#) ; [Nishitani et al, 2009](#) ; [Varendi et al, 1998](#)). Ces odeurs expérimentées *in utero* et *ex utero* les premiers jours de vie sont donc perçues par le nouveau-né comme des odeurs familières, apaisantes. Mais seules deux études menées chez 2 espèces différentes (souris et porc) ont montré les effets positifs d'une exposition à des odeurs artificielles apprises pendant la gestation et la lactation sur la modulation du stress du jeune lorsqu'il est soumis à des conditions de stress (odeur de prédateur pour la souris – sevrage pour le porc) en présence de l'odeur expérimentée en périnatal ([Matsukawa et al, 2016](#) ; [Oostindjer et al, 2011](#)). L'ajout de l'heptanal dans l'alimentation des mères a conduit à une modification de l'empreinte olfactive acquise par le souriceau. L'heptanal 10% serait donc associé par le souriceau à l'odeur maternelle ou celle du



nid, ce qui participerait à la diminution du stress chez les souriceaux issus de mères exposées à l'heptanal dans le cadre des OPF HEP. D'un point de vue mécanistique, on peut supposer que l'effet révélé par l'OPF est associé à une diminution de la réactivité de l'axe du stress chez l'animal, même si nous n'avons pas évalué l'état endocrinien des animaux dans cette étude. En effet, les quelques études ayant exploré les effets apaisants d'une odeur ont associé les effets comportementaux observés à une modulation de l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien (HPA). Ainsi deux études ont décrit une diminution du taux d'hormone corticotrope circulante (ACTH) dans le plasma, hormone libérée suite à un stress, et une suppression de l'hyperthermie corporelle, induite également suite à un stress, après inhalation d'une odeur artificielle (Akutsu et al, 2002 et 2003 ; Fukui et al, 2007 ; Nakashima et al, 2004). Leur modulation traduit une inhibition de l'axe HPA (Aguilera, 1994 ; Cabanac et Briese, 1992 ; McEwen et al, 1986 ; Shibata et Nagasaka, 1982). Une diminution du taux de cortisol salivaire ou une diminution du taux d'ACTH ont été observés chez de jeunes animaux soumis à un stress en présence de l'odeur avec laquelle ces derniers ont été familiarisés pendant la période périnatale, soit via l'environnement soit via l'alimentation de la mère (Matsukawa et al, 2016 ; Oostinjer et al, 2011), confirmant ainsi cette hypothèse.

Afin de mieux comprendre les mécanismes mis en jeu dans notre modèle, ayant conduit à une diminution du comportement de stress suite à une exposition périnatale à l'heptanal, nous pourrions réaliser à nouveau une série d'expériences, en utilisant les mêmes conditions expérimentales, et en effectuant des prélèvements de sang sur les souriceaux après le test OPF afin de doser le taux d'ACTH ou de cortisol dans le plasma des animaux des 2 groupes et voir si leur niveau est modifié entre les groupes d'animaux. Nous pourrions également prendre la température des souriceaux avant et après le test OPF et observer s'il y a diminution de l'hyperthermie consécutive à l'application d'un stress, dans les conditions d'odorisation correspondant à l'environnement odorant familial du souriceau. Nous pourrions ainsi conclure sur l'origine des effets comportementaux observés.

### **III. Effets d'une exposition périnatale à l'heptanal sur la plasticité du BO et de la MO**

#### **A. Plasticité du BO**

##### **Exposition odorante périnatale et postnatale**

Cette étude est la première à avoir comparé l'évolution des effets comportementaux et moléculaires suite à une exposition odorante périnatale, à 2 stades du développement

postnatal dans un modèle de maturation glomérulaire précoce. En effet, dans le modèle *mI7-GFP*, les glomérules I7 ventraux et médiaux sont formés à la naissance, contrairement aux glomérules M71, M72 et MOR23 qui ont été étudiés pour leur plasticité postnatale et dont la mise en place se fait après la naissance (Cadiou et al, 2014 ; Ker et Belluscio, 2006 ; Liu A. et al, 2016 ; Potter et al, 2001 ; Valle-Leija et al, 2012 ; Zou et al, 2004). Une étude récente suggère que les NSOs formés pendant la période périnatale sont responsables de l'établissement de la carte de convergences des projections axonales, alors que les NSOs formés plus tard vont venir se connecter aux glomérules par interaction homotypique entre neurones exprimant le même récepteur olfactif selon la carte de convergence établie en périnatale (Ma et al, 2014). Notre hypothèse était donc que l'ajout d'un composé odorant dans l'environnement olfactif des souriceaux pendant la mise en place des convergences axonales, c'est-à-dire pendant la période prénatale pour les souris *mI7-GFP*, en plus de la période postnatale, pourrait induire des effets sur la structuration des glomérules plus marqués que ceux déjà observés après une exposition odorante uniquement postnatale (Todrank et al, 2011 ; Valle-Leija et al, 2012). Au final, l'exposition périnatale à l'heptanal via l'alimentation de la mère a impacté la structuration du glomérule médian de la même façon qu'une exposition odorante postnatale uniquement, induisant la formation de glomérules surnuméraires visibles à PN12 puis à l'âge du sevrage, sans modifier le volume total du glomérule (Valle-Leija et al, 2012). Il semblerait donc que l'exposition odorante ait provoqué une redistribution du volume glomérulaire total en plusieurs glomérules de petite taille, visibles dès la naissance. A noter que dans cette étude, nous nous sommes limités à l'analyse du glomérule médian, le glomérule ventral, de par sa position au niveau du BO, fait que très souvent il était abimé voir même absent des prélèvements de BO que nous avons effectués. Cependant, une étude récente a montré que les glomérules M72 médians et ventraux étaient impactés de la même façon après une exposition odorante périnatale (Liu A et al, 2016). Nous devrions donc en théorie retrouver un effet comparable sur le glomérule ventral. Il ne nous est pas permis d'accéder à des remaniements structuraux qui affecteraient d'autres glomérules, potentiellement impliqués dans la reconnaissance de l'heptanal.

### **Augmentation du nombre de glomérules sans modification du volume total**

L'exposition périnatale à l'heptanal a donc induit des perturbations des projections axonales des NSOs I7, qui, au lieu de projeter sur un glomérule unique dont le volume augmente au cours du temps, projettent sur différents glomérules proches, de plus petite taille, tout en conservant un volume total comparable. Ceci laisse supposer que le nombre de

projections axonales, et donc le nombre de NSOs I7 présents dans la MO, restent inchangés lors de l'odorisation. Pour compléter cette étude, il serait intéressant d'effectuer un comptage de la densité des corps cellulaires des NSOs I7 au niveau de la MO. Cette hypothèse d'une stabilité de la quantité de NSOs présents dans la MO suite à une exposition périnatale à l'heptanal est difficile à réconcilier avec la légère diminution dans l'expression du récepteur mI7 ainsi que des 2 gènes de type neuronal chez les souriceaux à PN21 issus de mères odorisées, qui accompagne la diminution d'EOG. De plus, dans d'autres modèles d'odorisation, les résultats indiquent plutôt un effet sur la densité neuronale, mais qui dépend des lignées. Un comptage des NSOs exprimant M71, MOR23 et rI7, suite à une exposition odorante postnatale avec les ligands de ces récepteurs a été effectué ([Cadiou et al, 2014](#) ; [Kerr et Belluscio, 2006](#)). Alors qu'aucune différence n'a été observée dans la densité des NSOs exprimant M71 après une exposition odorante, une diminution du nombre de NSOs exprimant MOR23 ou rI7 a été mise en évidence chez les souriceaux issus de mères odorisées aux odorants correspondants. Ainsi, une diminution de la quantité de NSOs mI7 dans la MO pourrait expliquer les résultats moléculaires et fonctionnels dans la MO, mais serait contradictoire avec le fait que les volumes glomérulaires totaux ne varient pas entre les animaux issus de mères non odorisées et ceux issus de mères odorisées dans le BO. Cependant, il faut dire que le calcul des volumes des glomérules sur des images de microscopie confocale est difficile, sujet à erreurs. De plus, l'EOG enregistre les courants des NSOs isoréceptifs autres que ceux d'I7, pouvant s'ajouter aux effets mesurés.

### **Volume et nombre glomérule : effet âge-dépendant**

Nous avons montré que l'effet de l'exposition périnatale à l'heptanal sur le nombre de glomérules surnuméraires était plus important chez les souriceaux à PN12 qu'à PN21, suggérant que ce nombre n'est pas peut être pas encore définitif à l'âge du sevrage, que la maturation des projections axonales I7 peut encore avoir lieu à un âge plus tardif, et que le volume gloméculaire a tendance à augmenter avec l'âge. Comme l'a étudié l'équipe de Valle-Leija ([Valle-Leija et al, 2012](#)), qui a montré une stabilisation du nombre de glomérules I7 et M72 entre PN20 et PN50, qui s'accompagne d'une éventuelle augmentation de volume gloméculaire total dépendant de l'âge, nous pourrions poursuivre notre étude en analysant les changements neuro-anatomiques chez les souriceaux issus de mères odorisées entre PN21 et PN50, afin d'observer si les glomérules surnuméraires visibles à PN21, à priori sous leur forme immature, vont persister ou disparaître après le sevrage suite à un raffinement post-natal tardif naturel. Comme cela a été montré pour les glomérules M71 et M72, de façon

naturelle lors de la maturation post-natale, les glomérules surnuméraires vont progressivement disparaître grâce à un processus de raffinement des projections axonales qui va se mettre en place, pour aboutir à un nombre final d'un glomérule unique, voir 2 glomérules (Zou et al, 2004). Cette maturation glomérulaire est dépendante du récepteur olfactif exprimé. Nous pourrions alors conclure sur un retard de maturation provisoire ou définitif induit par une exposition périnatale à l'heptanal. En effet, deux hypothèses sont possible : les glomérules surnuméraires peuvent résulter d'un délai dans le processus de maturation plus important (Ker et Belluscio, 2006 ; Pomeroy et al, 1990) ou correspondent à la formation de structures fonctionnelles permanentes, en réponse à une augmentation de l'activité liée à l'exposition odorante périnatale (Liu A et al, 2016). Dans le cas où ces glomérules I7 surnuméraires persisteraient à l'âge adulte, nous pourrions étudier leur fonctionnalité, en réalisant par exemple une carte d'activation glomérulaire par imagerie intrinsèque, suite à une stimulation odorante à l'heptanal et ensuite observer s'ils sont fonctionnels (Rubin et Katz, 1999 ; Uchida et al, 2000).

### **Volume et nombre glomérule : effets observés différents**

De façon surprenante, l'équipe de Todrank a montré l'effet d'une exposition odorante périnatale via l'alimentation uniquement sur le volume des glomérules M72 chez des souriceaux à PN20 mais à aucun moment la présence de glomérule surnuméraire a été observée (Todrank et al, 2011). Pourtant, dans l'étude de Valle-Leija et ses collaborateurs, la présence de glomérules surnuméraires a été mise en évidence à PN20, suite à une exposition odorante postnatale. Les résultats que nous avons obtenus avec la lignée de souris mI7-GFP sur la structuration des glomérules s'apparente donc plus aux effets mis en évidence dans la seconde étude (Valle-Leija et al, 2012). A part quelques différences subtiles dans les procédures d'exposition odorante, de telles divergences entre laboratoires peuvent être dues aux conditions d'élevage. En effet, une étude récente a montré qu'elles pouvaient impacter le volume et la taille des glomérules (Oliva et al, 2010). Des différences entre lignées peuvent également être à l'origine de ces différences.

Pour pouvoir émettre des généralités sur les effets d'une exposition odorante périnatale sur la plasticité spécifique des glomérules, un plus grand nombre d'études menées sur différents couples odorant / récepteur olfactif serait nécessaire (Valle-Leija et al, 2015).

## B. Plasticité de la MO

Au niveau de la MO, nos résultats ont montré que les circuits olfactifs I7 présentent une plasticité neuroanatomique et moléculaire suite à une exposition périnatale à l'heptanal chez des animaux *mI7-GFP* à PN21, comme cela a été observé pour MOR23 lors d'une exposition postnatale aux odeurs de lyral (Cadiou et al, 2014). La diminution de l'expression de I7 et d'autres gènes de type neuronal dans la MO des souriceaux *mI7-GFP* issus de mères odorisées, bien que plutôt faible, pourrait expliquer la diminution de l'amplitude des réponses EOG suite à une stimulation à l'heptanal. Il est à noter que la diminution de l'expression des gènes n'a été significative que pour l'heptanal, ce qui suggère une spécificité de l'environnement odorant sur la plasticité de la MO, comme indiqué précédemment (Cadiou et al, 2014). Plusieurs phénomènes pourraient expliquer une telle adaptation fonctionnelle comme une modulation au niveau du nombre de NSOs, des propriétés individuelles des NSOs, de la modification d'autres populations de NSOs répondant à l'heptanal, ou même des changements dans les propriétés de connectivité avec le BO, comme cela a été observé ici et précédemment dans d'autres modèles (Cavallin et al, 2010 ; Liu et al, 2016 ; Geramita et Urban, 2016). Pour aller plus loin dans cette étude, il serait intéressant de mesurer les réponses électrophysiologiques individuelles, suite à des stimulations odorantes, de NSO unique et d'étudier l'expression individuelle de I7 et des gènes de type neural sur NSO unique.

## IV. Conclusion

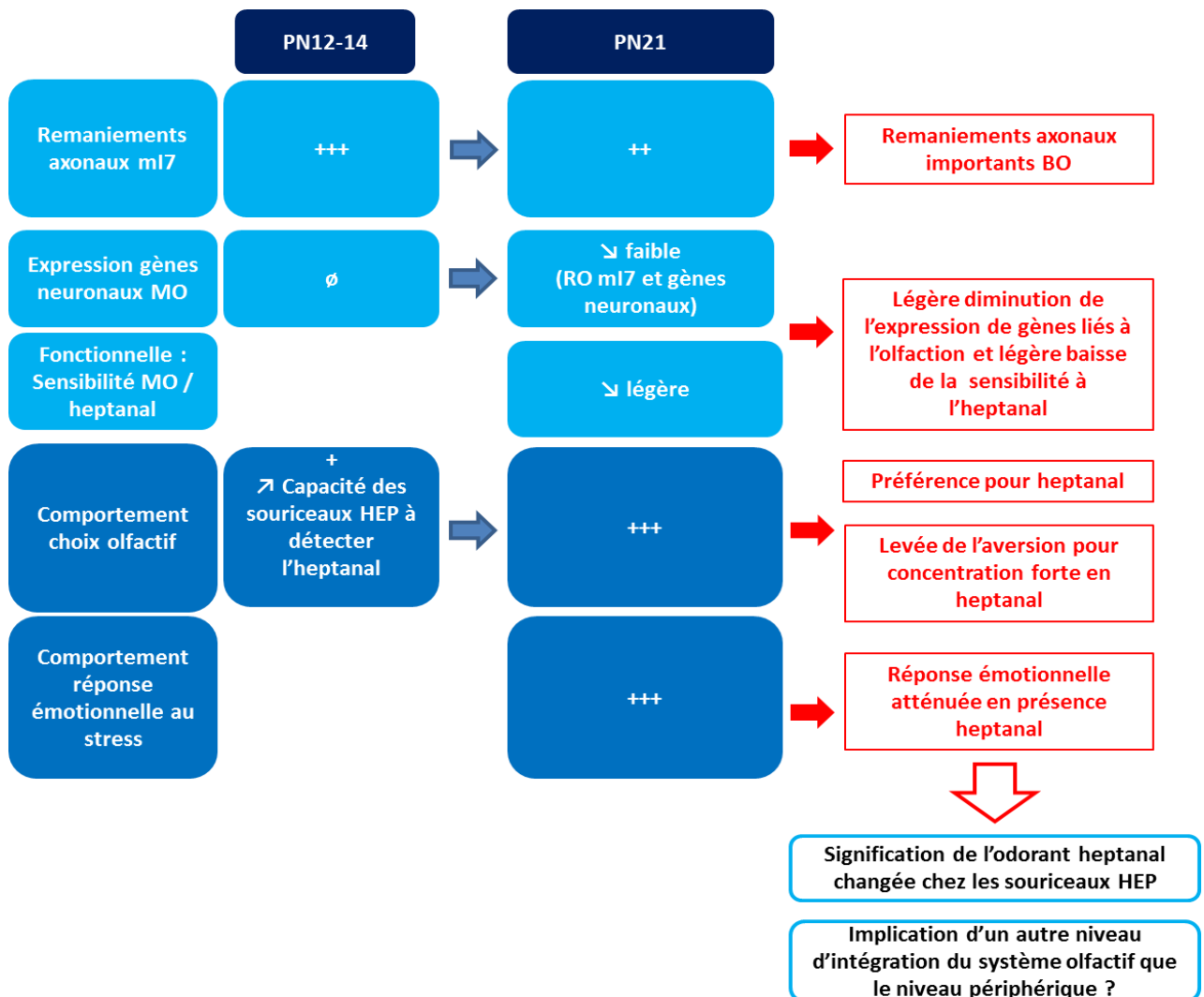
En conclusion, nous avons étudié les effets d'une exposition périnatale à l'heptanal sur la plasticité du système olfactif à 2 niveaux : le BO et la MO, et leur résultante sur certains comportements impliquant cette source odorante et nous avons suivi l'évolution de ces effets à 2 âges : PN12-14 et PN21. Une synthèse des résultats obtenus est donnée **Figure 53**.

A PN12-14, alors que nous avons observé un effet marqué au niveau du BO, se traduisant par des remaniements axonaux mI7 importants, nous n'avons pas vu d'effet sur la plasticité et sur la sensibilité à l'heptanal de la MO et très peu d'effet sur le comportement médié par l'heptanal.

A PN21, nous avons également décrit des remaniements axonaux au niveau du BO, mais moins marqués qu'à PN12-14. En revanche, nous avons observé un faible effet sur la plasticité de la MO qui s'est traduit par une diminution de l'expression du RO mI7 et de certains gènes neuronaux, une légère baisse de la sensibilité de la MO pour l'heptanal et nous avons pu observer des effets comportementaux marqués avec une nette préférence des

souriceaux HEP pour une source d'heptanal et une atténuation de leur réponse émotionnelle au stress en présence d'heptanal.

Malgré une organisation glomérulaire perturbée par l'odorisation et une sensibilité périphérique à l'heptanal diminuée, les animaux HEP perçoivent l'heptanal et expriment une préférence marquée pour cet odorant par rapport à des animaux non exposés. On peut penser que l'odorisation périnatale a induit une modification de la signification de l'odorant chez les souriceaux HEP à un niveau d'intégration plus central que le niveau périphérique, très certainement en lien avec l'apprentissage dans une phase critique de leur développement. Cette plasticité pourrait participer à rendre plus discriminant l'environnement olfactif tenant compte de l'« historique » passée de l'animal et permettre l'expression de comportements plus adéquats.



**Figure 53** : Schéma de synthèse regroupant les différents effets obtenus sur la plasticité structurale du BO, la plasticité de la MO et les comportements médiés par l'olfaction, suite à une exposition pré et post-natale à l'heptanal chez des souriceaux à PN12-14 et PN21.

## V. Difficultés rencontrées

### A. Difficultés liées au modèle d'odorisation

Nous avons choisi d'odoriser les animaux via la nourriture maternelle alors que d'autres études utilisent le biberon (Logan et al, 2012 ; Nolte et al, 1994) ou l'odorisation passive par l'environnement (Barbour et al, 2008 ; Kerr et Belluscio, 2006). Compte-tenu du fait que la plupart des composants odorants retrouvés dans le liquide amniotique et dans le lait maternel proviennent de l'alimentation de la mère ou de leurs métabolites (Etievant et al, livre Flavor, 2016), il nous a semblé judicieux d'utiliser cette voie d'odorisation.

Malgré le fait que l'exposition odorante soit effectuée en continu dans les deux derniers tiers de la gestation, nous avons observé une hétérogénéité au niveau quantitatif entre fluides, mais également entre individus, plus particulièrement dans les laits PN12, et ce pour les 2 lignées de souris. Les variations inter-individuelles peuvent être reliées aux résultats des mesures de consommations journalières moyennes de nourriture pour lesquelles nous avons également observé des variations. L'intervalle de temps entre la consommation en nourriture des souris et le prélèvement des échantillons pourrait également expliquer ces variations. Les souris étant nourries *ad libitum*, elles ne mangent donc pas de façon synchrone, nous n'avons pas pu contrôler ce paramètre. Des variations inter- et intra-individus ont déjà été mises en évidence dans du lait maternel chez l'humain pour différents composés odorants : d-carvone, l-menthol, 3-methylbutyl acetate, trans-anethole et eucalyptol (Kirsh et al, 2012 et 2013 ; Scheffler et al, 2016). Enfin, ces variations peuvent également être dues à des différences entre individus au niveau de la vitesse de métabolisation de l'heptanal par le foie. Les variations inter fluides peuvent s'expliquer par le fait que le passage des métabolites dans les différents fluides maternels se fait selon une cinétique propre à la nature du composé odorant et du fluide dans lequel il va être métabolisé. Ainsi, la plupart des composés odorants étudiés ont été retrouvés dans le lait maternel 2h après ingestion chez l'humain (Hausner et al, 2008 ; Mennella et al, 1991a et 1999), et 1 à 2h chez l'ovine (Desage et al, 1996) (Nolte et al, 1992). Ces différences inter fluides peuvent illustrer des différences au niveau des barrières biologiques et une cinétique de métabolisation différente entre le placenta et la glande mammaire entre espèces.

Même si ces résultats d'analyse laissent penser que les souriceaux ont été odorisés différemment, en moyenne sur la durée de l'exposition odorante, les niveaux d'odorisation ont dû être lissés. Les analyses statistiques n'ont d'ailleurs pas révélé d'effet « portée ».

## B. Difficultés liées à l'adoption

Les différents problèmes rencontrés avec les souriceaux *mI7-GFP* (Cf Résultats Chapitre I) nous ont conduits à procéder à des adoptions à la naissance par des mères de la lignée CD1. Face à la mortalité périnatale, nous suspectons des problèmes liés aux soins maternels apportés aux souriceaux, ou à la mise en place de la lactation chez ces souris, ou à la composition nutritive du lait, plutôt qu'à un problème physiologique des souriceaux. En effet, l'état de santé des souriceaux (aspect général, poids corporel) tout à fait normal à la naissance, se dégrade par la suite, pendant la période de mise en place de lactation pendant laquelle les soins apportés par la mère sont primordiaux pour la survie du souriceau. Pour réaliser les adoptions, nous avons choisi la lignée de souris CD1, car d'après les données de reproduction fournies par les laboratoires Janvier, ces souris semblent être de bonnes mères (Cf fiche technique Janvier Labs, <http://www.janvier-labs.com/rodent-research-models-services/research-models/per-species/outbred-mice/product/swiss.html> ). L'augmentation du pourcentage de survie des souriceaux dans les 48h suivant la naissance et une croissance normalisée (Cf partie Résultats Chapitre I) nous ont permis de prouver les effets bénéfiques de ces adoptions pour disposer d'un nombre d'animaux dans un état sanitaire adapté aux études que nous voulions mener et de confirmer que le problème venait des mères *mI7-GFP* et non des souriceaux. Cependant, nous n'avons pas effectué d'analyses pour identifier les origines du problème rencontré avec ces souris, mais nous avons observé que certaines femelles *mi7* étaient capables d'élever leur portée sans mortalité périnatale excessive (non montré). Il serait intéressant d'étudier le comportement maternel de ces souris au moment de la naissance, puis les jours suivant. Une absence de soins maternels à ce stade pourrait expliquer le fort pourcentage de mortalité dans les 48h suivant la naissance. En effet, en absence de soins maternels, les souriceaux ne sont pas capables de s'orienter correctement vers la mamelle. Dans le cas où les résultats ne montreraient pas de problème lié à ces soins, une analyse de la composition nutritionnelle du lait de ces souris pourrait être effectuée. En plus d'améliorer l'état de santé des souriceaux *mI7-GFP* adoptés, ces adoptions nous ont également permis de travailler sur un autre modèle murin, les souris CD1. En effet, en effectuant ces adoptions nous avons à plusieurs reprises rencontré des problèmes de coordination au niveau des gestations des 2 lignées. Ainsi, des femelles CD1 ont mis bas sans avoir de souriceaux *mI7-GFP* à adopter. Pour des raisons éthiques, nous avons donc décidé de



mener l'étude sur la partie comportementale liée au stress sur ces animaux CD1 sous leur mère biologique.

### **Stress occasionné par l'adoption**

Nous n'avons pas pris en compte les effets négatifs potentiellement induits par l'adoption. En effet, l'adoption pourrait engendrer un stress chez les mères CD1 séparées de leurs propres souriceaux et un stress des souriceaux *mI7-GFP* séparés de leur mère biologique. Les soins maternels apportés aux souriceaux pendant la période post-natale, de la naissance au sevrage, sont essentiels à leur développement et influencent directement leur phénotype comportemental et cognitif. Des perturbations au niveau des interactions mère-souriceau dans cette période sensible, telles que la manipulation répétée, la séparation maternelle et l'adoption, peuvent modifier les fonctions comportementales et cognitives à l'âge adulte, et ces effets dépendent de la souche (Anisman et al, 1998 ; Caldji et al, 2004 ; Lerch et al, 2014 ; Levine, 2005 ; Luchetti et al, 2015 ; Meaney et al, 1991 ; Priebe et al, 2005). Toutefois, une étude comparant les soins maternels apportés par deux souches de souris, C57BL/6 et DBA/2J, à leurs propres souriceaux ou à des souriceaux adoptés (croisement entre les 2 lignées) a montré que l'adoption inter souche ne semble pas avoir d'effet sur la qualité des soins maternels apportés aux souriceaux adoptés (van der Veen et al, 2008). De plus, nous avons minimisé au maximum les effets délétères en effectuant les adoptions le plus rapidement possible, selon un protocole bien établi.

Au final, le stress potentiel des mères ainsi que des souriceaux, occasionné par l'adoption, pourrait affecter à court et/ou long terme le comportement olfactif des souriceaux et impacter les résultats obtenus. Peu de données relient stress et olfaction, bien qu'il ait été montré que des récepteurs aux glucocorticoïdes sont exprimés dans le système olfactif (Robinson et al, 1998), et que les glucocorticoïdes seraient susceptibles d'agir sur la régénération tissulaire de la MO (Ohta et al, 2002). In vivo, une étude récente menée chez le rat adulte a montré qu'une activation répétée de l'axe Hypothalamo-pituitaire-surrénal (HPA) peut induire des modifications au niveau de la sensibilité olfactive et de l'homéostasie de la MO (Raynaud et al, 2015). Cependant, même si nous n'avons pas enregistré de données pour le justifier, nous n'avons pas observé de différence ni dans le comportement maternel des mères CD1 vis-à-vis des souriceaux adoptés, ni dans le comportement général des souriceaux *mI7-GFP* adoptés par rapport à d'autres souches. Il paraît donc difficile de faire une hypothèse quant à l'état d'anxiété modifié ou non chez les souriceaux *mI7-GFP* et l'impact que cela pourrait avoir sur

leur comportement olfactif. En tout état de cause, le taux de survie et l'état général des animaux semblent pleinement justifier une adoption. De plus, cette adoption était souhaitée car nous voulions également étudier des souriceaux au statut d'odorisation croisé à la naissance, afin de mesurer l'impact respectif de la phase pré-natale et post-natale. Enfin, s'il y a un effet de la séparation maternelle sur le stress, il est probablement intégré de manière identique entre les animaux odorisés et non odorisés.

### **Adoptions croisées : perspectives**

Afin de déterminer si les effets que nous avons observés chez les souriceaux odorisés sont majoritairement la conséquence de l'exposition odorante pendant uniquement la gestation ou pendant uniquement la lactation ou pendant les 2 périodes cumulées, nous souhaitions observer des individus en odorisation croisée dès la naissance, en faisant adopter des souriceaux issus de femelles *mI7-GFP* nourries avec des croquettes NO par des femelles CD1 nourries avec des croquettes HEP et inversement. Faute de temps, nous n'avons pas pu effectuer cette étude. Todrank et ses collaborateurs ont étudié ces 2 fenêtres d'exposition (gestation ou lactation) chez 2 lignées de souris transgénique, *M71-GFP* et *M72-GFP*, avec respectivement des expositions à l'acétophénone ou à l'isopropyl tiglate via l'alimentation de la mère, et ont pu observer des effets comportementaux et structuraux comparables, quelle que soit la fenêtre d'exposition (Todrank et al, 2011). Sachant que la formation des glomérules *i7* se fait plus précocement que celle des *M71* et *M72* pendant la période postnatale, nous pensons pouvoir observer des effets différentiels selon la fenêtre d'exposition.

Toutefois, une étude menée chez le lapin a montré qu'un changement du régime alimentaire de la mère au moment de la naissance pouvait avoir des conséquences importantes sur la physiologie du nouveau-né dont la continuité olfactive transnatale est interrompue. Ainsi les nouveau-nés montrent une diminution du succès pour engendrer les premières tétées et une diminution de la quantité de lait maternel ingérée par rapport à des nouveau-nés dont la continuité olfactive transnatale n'a pas été modifiée (Coureaud et al, 2002). Le pourcentage de survie à la naissance et la croissance des souriceaux pourraient être affectés par ces adoptions croisées, ce qui pourrait non seulement diminuer les effectifs pour effectuer les tests mais surtout affecter le comportement olfactif des souriceaux.

### **C. Choix de la fenêtre temporelle d'exposition odorante**

Nous avons choisi comme fenêtre temporelle d'exposition odorante, les périodes de gestation (à partir de E8) et de lactation (jusqu'à PN21) cumulées, soit une exposition odorante continue entre E8 et PN21.

Nous aurions pu débiter l'exposition odorante dès E0, mais nous avons voulu minimiser les effets négatifs pouvant être engendrés par le stress occasionné aux mères lors du changement de croquettes, au moment de la formation du fœtus, tout en étant certains qu'elle soit effective au moment des événements majeurs de la mise en place du système olfactif (à partir de E10). En effet, l'exposition des mères à différents facteurs de stress pendant la gestation peut provoquer chez elles des désordres métaboliques et neuroendocriniens qui vont engendrer des modifications du comportement émotionnel chez les petits (Del Cerro et al, 2015 ; Lerch et al, 2014). Ces effets sont habituellement observés après le sevrage et sont spécifiques au genre, même une altération au niveau des préférences olfactives pour l'odeur du nid maternel a été observée chez des souriceaux femelles de 7 jours dont les mères ont subi un stress pendant la gestation (De Souza et al, 2012). Compte-tenu du fait que nous n'avons pas observé de différence de consommation entre les croquettes normales et les croquettes odorisées à l'heptanal les 4 jours avant et les 4 jours après le changement chez les 2 lignées de souris, ni de différence de développement entre les souriceaux du groupe NO et ceux du groupe HEP, nous avons conclu que le changement de croquettes à E8, bien que sans transition, n'a eu qu'un faible impact sur les mères.

Nous ne pouvons pas exclure que les effets que nous avons pu observer au cours de cette étude ne sont pas liés à une exposition environnementale indirecte de l'heptanal avant et après la naissance (Smotherman et Robinson, 1990), plutôt que par l'imprégnation combinée successive via le liquide amniotique puis le lait maternel. En effet, avant la naissance, les souriceaux ont pu être influencés par l'environnement olfactif des mères qui a été modifié avec l'ajout de croquettes odorisées dans les cages, conduisant à la présence d'heptanal dans l'air environnant. Puis après la naissance, l'environnement olfactif des souriceaux va également être imprégné par les croquettes odorisées à l'heptanal et à partir de PN14, les souriceaux vont même commencer à consommer des croquettes odorisées à l'heptanal par eux-mêmes. Pour valider le fait que les effets que nous observons sur le comportement olfactif et la plasticité du système olfactif des souriceaux sont uniquement induits par l'exposition périnatale à l'heptanal, il faudrait également conduire les mêmes expériences à partir d'un lot témoin « environnement » pour lequel des femelles gestantes seraient placées à partir de E8 dans la même cellule que les femelles du groupe HEP, consommant des croquettes odorisées, mais en laissant ces femelles avec des croquettes non odorisées.

## **D. Difficultés liées aux tests olfactifs**

### **Tests d'orientation de la tête et temps latence pour téter à PN3**

Notre souhait était de mesurer les effets de l'adoption sur les préférences olfactives des souriceaux à des stades très précoces après l'exposition odorante, au moment de la naissance et de la mise en place de la lactation, période cruciale pour la survie du nouveau-né, ce que nous ne sommes par parvenus à réaliser malgré plusieurs essais. Le test d'orientation de la tête mis au point par Al Aïn et ses collaborateurs (Al Aïn et al, 2012) à la naissance, entre 1 et 3 jours postnatal, a été essayé sans succès. L'utilisation d'un papier filtre à la concentration en heptanal à  $10^{-6}$ M, choisi de façon empirique, n'était pas forcément judicieux. De plus, les souriceaux étaient, la plupart du temps, endormis, ou dans de rares cas étaient au contraire très excités. Nous avons donc adapté un autre test mis au point par la même équipe (Al Aïn et al, 2013) à l'aide de mères anesthésiées comme support pour ce test. Nous souhaitions augmenter l'intérêt des souriceaux, et nous affranchir du choix de la concentration en heptanal à utiliser. Ce test ne nous pas non plus permis de conclure à un effet de l'odorisation sur la latence à téter, mais l'état des souriceaux *mI7-GFP* non adoptés est très certainement venu biaiser les résultats. Il serait intéressant de répéter ce test sur des souriceaux *mI7-GFP* adoptés entre PN0 et PN3, comme cela a déjà été montré chez le rongeur dans quelques études (Gaztanaga et al, 2015 ; Logan et al, 2011 ; Pederson et Blass, 1982). Ces 3 études ont prouvé qu'il était possible, chez le rongeur, de générer un attrait pour un odorant de façon très précoce. Cependant, faute de temps, nous avons travaillé sur des stades plus tardifs, avec des animaux plus robustes, à l'aide de tests utilisés dans l'unité sur la souris adulte.

### **Tests planche à trous PN14 et PN21**

Le test de planche à trous nous a permis de montrer qu'une exposition périnatale à l'heptanal conduit au développement de préférences guidées par l'heptanal chez des souriceaux *mI7-GFP* à PN21, induisant une augmentation du temps d'exploration de l'heptanal lorsqu'il est présenté seul. Nous avons réalisé ces tests en proposant aux souriceaux le choix entre un support (papier filtre ou croquette) imprégné d'heptanal versus un support non imprégné. Nous pourrions maintenant reproduire ce même test, sur des souriceaux à PN21, mais en les confrontant cette fois-ci à un support imprégné d'heptanal versus un support imprégné d'une odeur non familière pour vérifier si l'effet comportemental observé est spécifique de l'odorant utilisé pour l'exposition périnatale ou s'il s'applique à n'importe

quel odorant non familier. Toujours pour vérifier la spécificité de l'effet comportemental engendré par l'exposition périnatale, nous pourrions également répéter ces tests, avec pour sources olfactives un support imprégné d'heptanal versus un support non imprégné comme contrôle, sur des souriceaux PN21, mais exposés à un autre odorant simple pendant la même période

Ce test effectué sur les mêmes animaux à PN14 ne nous a pas réellement permis de conclure quant à un effet de l'exposition à l'heptanal sur les préférences médiées par l'olfaction des souriceaux à cet âge, même si nous avons observé un intérêt des animaux odorisés pour la plus faible concentration. Mais, de ce que nous avons pu observer en réalisant les tests, le support utilisé ne semble pas adapté pour des souriceaux de cet âge, dont la mobilité reste réduite. A cet âge, un test plus simple avec un choix de positionnement dans un compartiment odorisé ou non, comme celui utilisé par Kerr et Belluscio sur des souriceaux à PN11 (Kerr et Belluscio, 2006) ou par Al Ain et ses collaborateurs sur des souriceaux à PN6 ou PN15 (Al Ain et al, 2012) semble plus adapté.

### **Test de préférence alimentaire : perspective**

Après avoir évalué les effets d'une exposition odorante périnatale sur les préférences médiées par l'olfaction du nouveau-né jusqu'au sevrage, nous pourrions étudier les effets à plus long terme sur les préférences alimentaires du jeune au moment du sevrage et de l'adulte. Il a déjà été montré chez d'autres espèces mammifères qu'une exposition odorante périnatale via l'alimentation de la mère, oriente les préférences alimentaires des animaux, comme par exemple chez le chat (Becques et al, 2009 ; Hepper et al, 2012) et le lapin (Bilko et al, 1994). Pour cela, nous pourrions faire des mesures de consommation de croquettes, en proposant aux souriceaux des croquettes odorisées ou non, au moment du sevrage à PN21 puis à l'âge adulte vers PN60.

### **E. Difficultés liées au test OPF**

Les résultats obtenus avec les tests menés en OPF odorisé et non odorisé ont montré qu'une exposition périnatale à l'heptanal permet de diminuer l'état de stress des souriceaux CD1 au sevrage lorsqu'ils sont placés dans un milieu stressant (OPF) en présence d'heptanal. Cependant, nous avons montré que la présence d'heptanal pendant l'événement de la séparation maternelle, ne semble pas avoir d'effet sur la réponse au stress testé en OPF. Le temps de 4h de séparation maternelle a été choisi car il avait été montré chez le porc que la

concentration en cortisol salivaire était différentiellement activée entre 4h et 7h après le sevrage entre des animaux odorisé ou non (Oostindjer et al, 2011). De plus, pour des raisons pratiques, le délai de 4h permettait de tester plusieurs séries d'animaux au cours d'une même expérience en conservant le même temps de séparation. Ce temps s'avère peut être trop important chez la souris et pourrait être la cause de la variabilité que nous avons pu observer. Nous avons choisi la séparation maternelle au sevrage comme stress à appliquer aux souriceaux car différentes études menés chez le rongeur ont montré qu'un tel traitement pouvait avoir conséquences sur les animaux à l'âge adulte, notamment une augmentation des comportements d'anxiété et des réponses endocriniennes aux facteurs de stress (Caldji et al, 2004 ; Ladd et al, 1996 ; Liu et al, 2000) et ces effets ont également été montrés lors d'un sevrage précoce chez le rongeur (Kanari et al, 2005 ; Kikusui et al, 2006). Cependant les effets de la séparation maternelle ont été observés à l'âge adulte. Dans notre cas, il semblerait que le simple fait de placer les animaux dans un lieu inconnu, tel que l'OPF, dans un environnement olfactif différent de celui familier aux animaux, soit suffisant pour générer chez eux une situation de stress.

## **VI. Conclusion générale**

L'étude que nous avons menée ici sur un modèle murin nous a permis d'associer des effets comportementaux sur les préférences médiées par l'olfaction et sur la modulation du stress, à une restructuration au niveau du BO, et une plasticité neuroanatomique et moléculaire au niveau de la MO.

Cette étude, réalisée à l'INRA de Jouy en Josas, au-delà des connaissances fondamentales qu'elle apporte sur la plasticité du système olfactif chez les rongeurs dans la période périnatale, peut avoir un intérêt agronomique. En effet, l'olfaction participe aux choix alimentaires de l'animal tout au long de sa vie. Moduler l'acceptabilité sensorielle des aliments est un levier important pour contrôler/favoriser la prise alimentaire dans diverses situations d'intérêt agronomique ou biomédical, avec des conséquences directes sur les rendements de production et/ou la santé. Dans le domaine agronomique, après une naissance gémellaire, phénomène très fréquent chez les ovins, les agneaux nouveau-nés surnuméraires sont séparés de leur mère qui ne peut subvenir aux besoins alimentaires de plusieurs agneaux, et doivent s'adapter au lait artificiel. Certaines enquêtes régionales font état de 14-17% de mortalité pendant cette période d'adaptation, pouvant atteindre 40 à 80% selon les espèces.

Une des raisons possibles serait que ce lait ne présente aucune caractéristique organoleptique du lait maternel. Comme chez d'autres espèces où les molécules odorantes perçues *in utero* facilitent l'acceptation de la tétine du nourrisseur grâce à la présence de ces mêmes composants dans le lait (Coureaud et al, 2002), une utilisation de l'odorisation périnatale comme levier d'adaptation à l'allaitement artificiel chez l'ovin pourrait être envisagé. Notre hypothèse est que les molécules odorantes perçues *in utero* peuvent faciliter l'adaptation des agneaux à un lait artificiel odorisé avec cette même odeur, par une persistance de la préférence alimentaire induite, et réduire la mortalité précoce liée au rejet du lait artificiel. Il serait donc intéressant de voir si ces effets comportementaux pourraient être transposés chez l'ovin, en réalisant donc une exposition odorante périnatale via l'alimentation de la mère, puis des tests comportementaux sur les agneaux.

## Références bibliographiques

- Abaffy, T., Malhotra, A., Luetje, C.W., 2007. The molecular basis for ligand specificity in a mouse olfactory receptor: a network of functionally important residues. *J. Biol. Chem.* 282, 1216–1224. doi:10.1074/jbc.M609355200
- Aguilera, G., 1994. Regulation of Pituitary ACTH Secretion during Chronic Stress. *Frontiers in Neuroendocrinology* 15, 321–350. doi:10.1006/frne.1994.1013
- Akutsu, H., Kikusui, T., Takeuchi, Y., Mori, Y., 2003. Effects of Alpha-Pinene Odor in Different Concentrations on Stress-Induced Hyperthermia in Rats. *Journal of Veterinary Medical Science* 65, 1023–1025. doi:10.1292/jvms.65.1023
- Akutsu, H., Kikusui, T., Takeuchi, Y., Sano, K., Hatanaka, A., Mori, Y., 2002. Alleviating effects of plant-derived fragrances on stress-induced hyperthermia in rats. *Physiology & Behavior* 75, 355–360. doi:10.1016/S0031-9384(01)00670-9
- Al Aïn, S., Belin, L., Patris, B., Schaal, B., 2012. An odor timer in milk? Synchrony in the odor of milk effluvium and neonatal chemosensation in the mouse. *PLoS ONE* 7, e47228. doi:10.1371/journal.pone.0047228
- Al Aïn, S., Goudet, C., Schaal, B., Patris, B., 2015. Newborns prefer the odor of milk and nipples from females matched in lactation age: Comparison of two mouse strains. *Physiol. Behav.* 147, 122–130. doi:10.1016/j.physbeh.2015.04.035
- Al Aïn Syrina, Amal Chraïti, Benoist Schaal, Bruno Patris, 2013. Orientation of Newborn Mice to Lactating Females: Identifying Biological Substrates of Semiochemical Interest.
- Anisman, H., Zaharia, M.D., Meaney, M.J., Merali, Z., 1998. Do early-life events permanently alter behavioral and hormonal responses to stressors? *International Journal of Developmental Neuroscience* 16, 149–164. doi:10.1016/S0736-5748(98)00025-2
- Araneda, R.C., Kini, A.D., Firestein, S., 2000. The molecular receptive range of an odorant receptor. *Nat Neurosci* 3, 1248–1255. doi:10.1038/81774
- Araneda, R.C., Peterlin, Z., Zhang, X., Chesler, A., Firestein, S., 2004. A pharmacological profile of the aldehyde receptor repertoire in rat olfactory epithelium. *J. Physiol. (Lond.)* 555, 743–756. doi:10.1113/jphysiol.2003.058040
- Aroniadou-Anderjaska, V., Ennis, M., Shipley, M.T., 1999. Current-Source Density Analysis in the Rat Olfactory Bulb: Laminar Distribution of Kainate/AMPA- and NMDA-Receptor-Mediated Currents. *Journal of Neurophysiology* 81, 15–28.
- Aroniadou-Anderjaska, V., Zhou, F.-M., Priest, C.A., Ennis, M., Shipley, M.T., 2000. Tonic and Synaptically Evoked Presynaptic Inhibition of Sensory Input to the Rat Olfactory Bulb Via GABABHeteroreceptors. *Journal of Neurophysiology* 84, 1194–1203.
- Aungst, J.L., Heyward, P.M., Puche, A.C., Karnup, S.V., Hayar, A., Szabo, G., Shipley, M.T., 2003. Centre-surround inhibition among olfactory bulb glomeruli. *Nature* 426, 623–629. doi:10.1038/nature02185
- Badiee, Z., Asghari, M., Mohammadzadeh, M., 2013. The calming effect of maternal breast milk odor on premature infants. *Pediatr Neonatol* 54, 322–325. doi:10.1016/j.pedneo.2013.04.004
- Bailey, M.S., Shipley, M.T., 1993. Astrocyte subtypes in the rat olfactory bulb: Morphological heterogeneity and differential laminar distribution. *J. Comp. Neurol.* 328, 501–526. doi:10.1002/cne.903280405
- Baker, H., 1990. Unilateral, neonatal olfactory deprivation alters tyrosine hydroxylase



- expression but not aromatic amino acid decarboxylase or gaba immunoreactivity. *Neuroscience* 36, 761–771. doi:10.1016/0306-4522(90)90018-Y
- Bannister, L.H., Dodson, H.C., 1992. Endocytic pathways in the olfactory and vomeronasal epithelia of the mouse: ultrastructure and uptake of tracers. *Microsc. Res. Tech.* 23, 128–141. doi:10.1002/jemt.1070230204
- Barber, C.N., Coppola, D.M., 2015. Compensatory plasticity in the olfactory epithelium: age, timing, and reversibility. *Journal of Neurophysiology* 114, 2023–2032. doi:10.1152/jn.00076.2015
- Barbour, J., Neuhaus, E.M., Piechura, H., Stoepel, N., Mashukova, A., Brunert, D., Sitek, B., Stühler, K., Meyer, H.E., Hatt, H., Warscheid, B., 2008. New insight into stimulus-induced plasticity of the olfactory epithelium in *Mus musculus* by quantitative proteomics. *J. Proteome Res.* 7, 1594–1605. doi:10.1021/pr7005796
- Barkat, S., Poncelet, J., Landis, B.N., Rouby, C., Bensafi, M., 2008. Improved smell pleasantness after odor–taste associative learning in humans. *Neuroscience Letters* 434, 108–112. doi:10.1016/j.neulet.2008.01.037
- Barnea, G., O'Donnell, S., Mancina, F., Sun, X., Nemes, A., Mendelsohn, M., Axel, R., 2004. Odorant receptors on axon termini in the brain. *Science* 304, 1468. doi:10.1126/science.1096146
- Becques, A., Larose, C., Gouat, P., Serra, J., 2010. Effects of pre- and postnatal olfactogustatory experience on early preferences at birth and dietary selection at weaning in kittens. *Chem. Senses* 35, 41–45. doi:10.1093/chemse/bjp080
- Beites, C.L., Kawauchi, S., Crocker, C.E., Calof, A.L., 2005. Identification and molecular regulation of neural stem cells in the olfactory epithelium. *Exp. Cell Res.* 306, 309–316. doi:10.1016/j.yexcr.2005.03.027
- Belzung, C., 1999. Chapter 4.11 Measuring rodent exploratory behavior, in: Gerlai, W.E.C. and R.T. (Ed.), *Techniques in the Behavioral and Neural Sciences, Handbook of Molecular-Genetic Techniques for Brain and Behavior Research*. Elsevier, pp. 738–749.
- Benson, T.E., Ryugo, D.K., Hinds, J.W., 1984. Effects of sensory deprivation on the developing mouse olfactory system: a light and electron microscopic, morphometric analysis. *J. Neurosci.* 4, 638–653.
- Bilkó, A., Altbäcker, V., Hudson, R., 1994. Transmission of food preference in the rabbit: the means of information transfer. *Physiol. Behav.* 56, 907–912.
- Bischofberger, J., Jonas, P., 1997. Action potential propagation into the presynaptic dendrites of rat mitral cells. *The Journal of Physiology* 504, 359–365. doi:10.1111/j.1469-7793.1997.359be.x
- Blanco-Hernández, E., Valle-Leija, P., Zomosa-Signoret, V., Drucker-Colín, R., Vidaltamayo, R., 2012. Odor memory stability after reinnervation of the olfactory bulb. *PLoS ONE* 7, e46338. doi:10.1371/journal.pone.0046338
- Bockaert, J., Pin, J.P., 1999. Molecular tinkering of G protein-coupled receptors: an evolutionary success. *EMBO J.* 18, 1723–1729. doi:10.1093/emboj/18.7.1723
- Boehm, U., Zou, Z., Buck, L.B., 2005. Feedback Loops Link Odor and Pheromone Signaling with Reproduction. *Cell* 123, 683–695. doi:10.1016/j.cell.2005.09.027
- Bozza, T., Feinstein, P., Zheng, C., Mombaerts, P., 2002. Odorant Receptor Expression Defines Functional Units in the Mouse Olfactory System. *J. Neurosci.* 22, 3033–3043.
- Brann, J.H., Firestein, S.J., 2014. A lifetime of neurogenesis in the olfactory system. *Front Neurosci* 8, 182. doi:10.3389/fnins.2014.00182
- Brechbühl, J., Klaey, M., Broillet, M.-C., 2008. Grueneberg ganglion cells mediate alarm pheromone detection in mice. *Science* 321, 1092–1095. doi:10.1126/science.1160770
- Breipohl, W., Laugwitz, H.J., Bornfeld, N., 1974. Topological relations between the dendrites

- of olfactory sensory cells and sustentacular cells in different vertebrates. An ultrastructural study. *J. Anat.* 117, 89–94.
- Brennan, P.A., Zufall, F., 2006. Pheromonal communication in vertebrates. *Nature* 444, 308–315. doi:10.1038/nature05404
- Bressel, O.C., Khan, M., Mombaerts, P., 2016. Linear correlation between the number of olfactory sensory neurons expressing a given mouse odorant receptor gene and the total volume of the corresponding glomeruli in the olfactory bulb. *J. Comp. Neurol.* 524, 199–209. doi:10.1002/cne.23835
- Briand, L., Eloit, C., Nespoulous, C., Bézirard, V., Huet, J.-C., Henry, C., Blon, F., Trotier, D., Pernollet, J.-C., 2002. Evidence of an odorant-binding protein in the human olfactory mucus: location, structural characterization, and odorant-binding properties. *Biochemistry* 41, 7241–7252.
- Brouette-Lahlou, I., Godinot, F., Vernet-Maury, E., 1999. The mother rat's vomeronasal organ is involved in detection of dodecyl propionate, the pup's preputial gland pheromone. *Physiol. Behav.* 66, 427–436.
- Brunjes, P.C., Borrer, M.J., 1983. Unilateral odor deprivation: Differential effects due to time of treatment. *Brain Research Bulletin* 11, 501–503. doi:10.1016/0361-9230(83)90121-1
- Brunjes Peter C., P., 1994. Unilateral naris closure and olfactory system development. *Brain Research Reviews* 19, 146–160. doi:10.1016/0165-0173(94)90007-8
- Buck, L., Axel, R., 1991. A novel multigene family may encode odorant receptors: a molecular basis for odor recognition. *Cell* 65, 175–187.
- Bushdid, C., Magnasco, M.O., Vosshall, L.B., Keller, A., 2014. Humans can discriminate more than 1 trillion olfactory stimuli. *Science* 343, 1370–1372. doi:10.1126/science.1249168
- Cabanac, A., Briese, E., 1992. Handling elevates the colonic temperature of mice. *Physiology & Behavior* 51, 95–98. doi:10.1016/0031-9384(92)90208-J
- Cadiou, H., Aoudé, I., Tazir, B., Molinas, A., Fenech, C., Meunier, N., Grosmaître, X., 2014. Postnatal odorant exposure induces peripheral olfactory plasticity at the cellular level. *J. Neurosci.* 34, 4857–4870. doi:10.1523/JNEUROSCI.0688-13.2014
- Caggiano, M., Kauer, J.S., Hunter, D.D., 1994. Globose basal cells are neuronal progenitors in the olfactory epithelium: a lineage analysis using a replication-incompetent retrovirus. *Neuron* 13, 339–352.
- Caldji Christian, Diorio Josie, Anisman Hymie and Meaney Michael J, 2004. Maternal Behavior Regulates Benzodiazepine/GABAA Receptor Subunit Expression in Brain Regions Associated with Fear in BALB/c and C57BL/6 Mice. *Neuropsychopharmacology*.
- Carter, L.A., MacDonald, J.L., Roskams, A.J., 2004. Olfactory horizontal basal cells demonstrate a conserved multipotent progenitor phenotype. *J. Neurosci.* 24, 5670–5683. doi:10.1523/JNEUROSCI.0330-04.2004
- Cau, E., Casarosa, S., Guillemot, F., 2002. Mash1 and Ngn1 control distinct steps of determination and differentiation in the olfactory sensory neuron lineage. *Development* 129, 1871–1880.
- Cau, E., Gradwohl, G., Fode, C., Guillemot, F., 1997. Mash1 activates a cascade of bHLH regulators in olfactory neuron progenitors. *Development* 124, 1611–1621.
- Cavallin, M.A., Powell, K., Biju, K.C., Fadool, D.A., 2010. State-dependent sculpting of olfactory sensory neurons is attributed to sensory enrichment, odor deprivation, and aging. *Neuroscience Letters* 483, 90–95. doi:10.1016/j.neulet.2010.07.059
- Chaigneau, E., Oheim, M., Audinat, E., Charpak, S., 2003. Two-photon imaging of capillary

- blood flow in olfactory bulb glomeruli. *PNAS* 100, 13081–13086. doi:10.1073/pnas.2133652100
- Chaigneau, E., Tiret, P., Lecoq, J., Ducros, M., Knöpfel, T., Charpak, S., 2007. The Relationship between Blood Flow and Neuronal Activity in the Rodent Olfactory Bulb. *J. Neurosci.* 27, 6452–6460. doi:10.1523/JNEUROSCI.3141-06.2007
- Chamero, P., Marton, T.F., Logan, D.W., Flanagan, K., Cruz, J.R., Saghatelian, A., Cravatt, B.F., Stowers, L., 2007. Identification of protein pheromones that promote aggressive behaviour. *Nature* 450, 899–902. doi:10.1038/nature05997
- Chao, T.I., Kasa, P., Wolff, J.R., 1997. Distribution of astroglia in glomeruli of the rat main olfactory bulb: Exclusion from the sensory subcompartment of neuropil. *J. Comp. Neurol.* 388, 191–210. doi:10.1002/(SICI)1096-9861(19971117)388:2<191::AID-CNE2>3.0.CO;2-X
- Chen, C.R., Kachramanoglou, C., Li, D., Andrews, P., Choi, D., 2014. Anatomy and cellular constituents of the human olfactory mucosa: a review. *J Neurol Surg B Skull Base* 75, 293–300. doi:10.1055/s-0033-1361837
- Chen, H., Dadsetan, S., Fomina, A.F., Gong, Q., 2008. Expressing exogenous functional odorant receptors in cultured olfactory sensory neurons. *Neural Development* 3, 22. doi:10.1186/1749-8104-3-22
- Chuah, M.I., Zheng, D.R., 1987. Olfactory marker protein is present in olfactory receptor cells of human fetuses. *Neuroscience* 23, 363–370. doi:10.1016/0306-4522(87)90296-X
- Conzelmann, S., Levai, O., Breer, H., Strotmann, J., 2002. Extraepithelial cells expressing distinct olfactory receptors are associated with axons of sensory cells with the same receptor type. *Cell Tissue Res.* 307, 293–301. doi:10.1007/s00441-001-0507-6
- Coppersmith, R., Leon, M., 1984. Enhanced neural response to familiar olfactory cues. *Science* 225, 849–852.
- Coppola, D.M., 2012. Studies of Olfactory System Neural Plasticity: The Contribution of the Unilateral Naris Occlusion Technique. *Neural Plasticity* 2012, e351752. doi:10.1155/2012/351752
- Coppola, D.M., Millar, L.C., 1997. Olfaction in utero: Behavioral studies of the mouse fetus. *Behavioural Processes* 39, 53–68. doi:10.1016/S0376-6357(96)00044-7
- Coureaud, G., Schaal, B., Hudson, R., Orgeur, P., Coudert, P., 2002. Transnatal olfactory continuity in the rabbit: behavioral evidence and short-term consequence of its disruption. *Dev Psychobiol* 40, 372–390. doi:10.1002/dev.10038
- Coureaud, G., Schaal, B., Langlois, D., Perrier, G., 2001. Orientation response of newborn rabbits to odours of lactating females: relative effectiveness of surface and milk cues. *Animal Behaviour* 61, 153–162. doi:10.1006/anbe.2000.1563
- Cummings, D.M., Brunjes, P.C., 1994. Changes in Cell Proliferation in the Developing Olfactory Epithelium Following Neonatal Unilateral Naris Occlusion. *Experimental Neurology* 128, 124–128. doi:10.1006/exnr.1994.1119
- Cuschieri, A., Bannister, L.H., Jul 1975b. The development of the olfactory mucosa in the mouse: electron microscopy. *J. Anat.* 119, 471–498.
- Cuschieri, A., Bannister, L.H., Apr 1975a. The development of the olfactory mucosa in the mouse: light microscopy. *J. Anat.* 119, 277–286.
- Dahl, A.R., 1988. The Effect of Cytochrome P-450-Dependent Metabolism and Other Enzyme Activities on Olfaction, in: Margolis, F.L., Getchell, T.V. (Eds.), *Molecular Neurobiology of the Olfactory System*. Springer US, pp. 51–70.
- De Carlos, J.A., López-Mascaraque, L., Valverde, F., 1995. The telencephalic vesicles are innervated by olfactory placode-derived cells: a possible mechanism to induce

- neocortical development. *Neuroscience* 68, 1167–1178.
- de Souza, M.A., Szawka, R.E., Centenaro, L.A., Diehl, L.A., Lucion, A.B., 2012. Prenatal stress produces sex differences in nest odor preference. *Physiology & Behavior* 105, 850–855. doi:10.1016/j.physbeh.2011.10.012
- Debarbieux, F., Audinat, E., Charpak, S., 2003. Action Potential Propagation in Dendrites of Rat Mitral Cells In Vivo. *J. Neurosci.* 23, 5553–5560.
- Débat, H., Eloit, C., Blon, F., Sarazin, B., Henry, C., Huet, J.-C., Trotier, D., Pernollet, J.-C., 2007. Identification of human olfactory cleft mucus proteins using proteomic analysis. *J. Proteome Res.* 6, 1985–1996. doi:10.1021/pr0606575
- Del Cerro, M.C.R., Ortega, E., Gómez, F., Segovia, S., Pérez-Laso, C., 2015. Environmental prenatal stress eliminates brain and maternal behavioral sex differences and alters hormone levels in female rats. *Hormones and Behavior* 73, 142–147. doi:10.1016/j.yhbeh.2015.07.004
- Del Punta, K., Leinders-Zufall, T., Rodriguez, I., Jukam, D., Wysocki, C.J., Ogawa, S., Zufall, F., Mombaerts, P., 2002. Deficient pheromone responses in mice lacking a cluster of vomeronasal receptor genes. *Nature* 419, 70–74. doi:10.1038/nature00955
- Désage, M., Schaal, B., Soubeyrand, J., Orgeur, P., Brazier, J.-L., 1996. Gas chromatographic-mass spectrometric method to characterise the transfer of dietary odorous compounds into plasma and milk. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* 678, 205–210. doi:10.1016/0378-4347(95)00527-7
- Dixon, R.A.F., Kobilka, B.K., Strader, D.J., Benovic, J.L., Dohlman, H.G., Frielle, T., Bolanowski, M.A., Bennett, C.D., Rands, E., Diehl, R.E., Mumford, R.A., Slater, E.E., Sigal, I.S., Caron, M.G., Lefkowitz, R.J., Strader, C.D., 1986. Cloning of the gene and cDNA for mammalian  $\beta$ -adrenergic receptor and homology with rhodopsin. *Nature* 321, 75–79. doi:10.1038/321075a0
- Dooley, R., Mashukova, A., Toetter, B., Hatt, H., Neuhaus, E.M., 2011. Purinergic receptor antagonists inhibit odorant-mediated CREB phosphorylation in sustentacular cells of mouse olfactory epithelium. *BMC Neuroscience* 12, 86. doi:10.1186/1471-2202-12-86
- Doucet, S., Soussignan, R., Sagot, P., Schaal, B., 2007. The “smellscape” of mother’s breast: effects of odor masking and selective unmasking on neonatal arousal, oral, and visual responses. *Dev Psychobiol* 49, 129–138. doi:10.1002/dev.20210
- Egger, V., Urban, N.N., 2006. Dynamic connectivity in the mitral cell–granule cell microcircuit. *Seminars in Cell & Developmental Biology, OlfactionAnimal Stem Cell Types* 17, 424–432. doi:10.1016/j.semcdb.2006.04.006
- Ennis, M., Zhou, F.-M., Ciombor, K.J., Aroniadou-Anderjaska, V., Hayar, A., Borrelli, E., Zimmer, L.A., Margolis, F., Shipley, M.T., 2001. Dopamine D2 Receptor–Mediated Presynaptic Inhibition of Olfactory Nerve Terminals. *Journal of Neurophysiology* 86, 2986–2997.
- Etiévant, P., Guichard, E., Salles, C., Voilley, A., Schaal, B., 2016. *Flavor: From Food to Behaviors, Wellbeing and Health*. Woodhead Publishing.
- Farbman, A.I., Brunjes, P.C., Rentfro, L., Michas, J., Ritz, S., 1988. The effect of unilateral naris occlusion on cell dynamics in the developing rat olfactory epithelium. *J. Neurosci.* 8, 3290–3295.
- Feinstein, P., Mombaerts, P., 2004. A contextual model for axonal sorting into glomeruli in the mouse olfactory system. *Cell* 117, 817–831. doi:10.1016/j.cell.2004.05.011
- Ferguson, C.H., Zhao, H., 2017. Simultaneous Loss of NCKX4 and CNG Channel Desensitization Impairs Olfactory Sensitivity. *J. Neurosci.* 37, 110–119. doi:10.1523/JNEUROSCI.2527-16.2017

- Figueres-Oñate, M., Gutiérrez, Y., López-Mascaraque, L., 2014. Unraveling Cajal's view of the olfactory system. *Front Neuroanat* 8. doi:10.3389/fnana.2014.00055
- Figuroa, J., Solà-Oriol, D., Vinokurovas, L., Manteca, X., Pérez, J.F., 2013. Prenatal flavour exposure through maternal diets influences flavour preference in piglets before and after weaning. *Animal Feed Science and Technology* 183, 160–167. doi:10.1016/j.anifeedsci.2013.04.023
- Firestein, S., 2001. How the olfactory system makes sense of scents. *Nature* 413, 211–218. doi:10.1038/35093026
- Frazier, L.L., Brunjes, P.C., 1988. Unilateral odor deprivation: Early postnatal changes in olfactory bulb cell density and number. *J. Comp. Neurol.* 269, 355–370. doi:10.1002/cne.902690304
- Fukui, H., Komaki, R., Okui, M., Toyoshima, K., Kuda, K., 2007. The effects of odor on cortisol and testosterone in healthy adults. *Neuro Endocrinol. Lett.* 28, 433–437.
- Gaztañaga, M., Aranda-Fernández, P.E., Chotro, M.G., 2015. Prenatal exposure to vanilla or alcohol induces crawling after these odors in the neonate rat: The role of mu and kappa opioid receptor systems. *Physiol. Behav.* 148, 58–64. doi:10.1016/j.physbeh.2014.12.046
- Geramita, M., Urban, N.N., 2016. Postnatal Odor Exposure Increases the Strength of Interglomerular Lateral Inhibition onto Olfactory Bulb Tufted Cells. *J. Neurosci.* 36, 12321–12327. doi:10.1523/JNEUROSCI.1991-16.2016
- Getchell, M.L., Getchell, T.V., 1991. Immunohistochemical localization of components of the immune barrier in the olfactory mucosae of salamanders and rats. *Anat. Rec.* 231, 358–374. doi:10.1002/ar.1092310310
- Getchell, T.V., 1986. Functional properties of vertebrate olfactory receptor neurons. *Physiol. Rev.* 66, 772–818.
- Getchell, T.V., Margolis, F.L., Getchell, M.L., 1984. Perireceptor and receptor events in vertebrate olfaction. *Prog. Neurobiol.* 23, 317–345.
- Godfrey, P.A., Malnic, B., Buck, L.B., 2004. The mouse olfactory receptor gene family. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101, 2156–2161. doi:10.1073/pnas.0308051100
- Goubet, N., Rattaz, C., Pierrat, V., Allémann, E., Bullinger, A., Lequien, P., 2002. Olfactory Familiarization and Discrimination in Preterm and Full-Term Newborns. *Infancy* 3, 53–75. doi:10.1207/S15327078IN0301\_3
- Goubet, N., Strasbaugh, K., Chesney, J., 2007. Familiarity breeds content? Soothing effect of a familiar odor on full-term newborns. *J Dev Behav Pediatr* 28, 189–194. doi:10.1097/dbp.0b013e31802d0b8d
- Graziadei, G.A., Graziadei, P.P., 1979. Neurogenesis and neuron regeneration in the olfactory system of mammals. II. Degeneration and reconstitution of the olfactory sensory neurons after axotomy. *J. Neurocytol.* 8, 197–213.
- Grosmaître, X., Santarelli, L.C., Tan, J., Luo, M., Ma, M., 2007. Dual functions of mammalian olfactory sensory neurons as odor detectors and mechanical sensors. *Nat. Neurosci.* 10, 348–354. doi:10.1038/nn1856
- Guillemot, F., Lo, L.C., Johnson, J.E., Auerbach, A., Anderson, D.J., Joyner, A.L., 1993. Mammalian achaete-scute homolog 1 is required for the early development of olfactory and autonomic neurons. *Cell* 75, 463–476.
- Guo, Z., Packard, A., Krolewski, R.C., Harris, M.T., Manglapus, G.L., Schwob, J.E., 2010. Expression of pax6 and sox2 in adult olfactory epithelium. *J. Comp. Neurol.* 518, 4395–4418. doi:10.1002/cne.22463

- Hai, P.V., Everts, H., Van Tien, D., Schonewille, J.T., Hendriks, W.H., 2012. Feeding *Chromonaela odorata* during pregnancy to goat dams affects acceptance of this feedstuff by their offspring. *Applied Animal Behaviour Science* 137, 30–35. doi:10.1016/j.applanim.2012.01.010
- Hall, 1934. Drive and emotionality: factors associated with adjustment in the rat. *Journal of Comparative Psychology* 17, 89–108. doi:10.1037/h0073676
- Hall, S.E., Floriano, W.B., Vaidehi, N., Goddard, W.A., 2004. Predicted 3-D Structures for Mouse I7 and Rat I7 Olfactory Receptors and Comparison of Predicted Odor Recognition Profiles with Experiment. *Chem. Senses* 29, 595–616. doi:10.1093/chemse/bjh063
- Hauser, G.J., Chitayat, D., Berns, L., Braver, D., Muhlbauer, B., 1985. Peculiar odours in newborns and maternal prenatal ingestion of spicy food. *Eur. J. Pediatr.* 144, 403.
- Hausner, H., Bredie, W.L.P., Mølgaard, C., Petersen, M.A., Møller, P., 2008. Differential transfer of dietary flavour compounds into human breast milk. *Physiol. Behav.* 95, 118–124. doi:10.1016/j.physbeh.2008.05.007
- Hepper, P.G., 1995. Human fetal olfactory learning. *The International journal of prenatal and perinatal psychology and medicine* 7, 147–151.
- Hepper, P.G., 1988. Adaptive fetal learning: Prenatal exposure to garlic affects postnatal preferences. *Animal Behaviour* 36, 935–936. doi:10.1016/S0003-3472(88)80177-5
- Hepper, P.G., 1987. The amniotic fluid: an important priming role in kin recognition. *Animal Behaviour*.
- Hepper, P.G., Wells, D.L., 2006. Perinatal olfactory learning in the domestic dog. *Chem. Senses* 31, 207–212. doi:10.1093/chemse/bjj020
- Hepper, P.G., Wells, D.L., Dornan, J.C., Lynch, C., 2013. Long-term flavor recognition in humans with prenatal garlic experience. *Dev. Psychobiol.* 55, 568–574. doi:10.1002/dev.21059
- Hepper, P.G., Wells, D.L., Millsopp, S., Kraehenbuehl, K., Lyn, S.A., Mauroux, O., 2012. Prenatal and early sucking influences on dietary preference in newborn, weaning, and young adult cats. *Chem. Senses* 37, 755–766. doi:10.1093/chemse/bjs062
- Heydel, J.-M., Coelho, A., Thiebaud, N., Legendre, A., Le Bon, A.-M., Faure, P., Neiers, F., Artur, Y., Golebiowski, J., Briand, L., 2013. Odorant-binding proteins and xenobiotic metabolizing enzymes: implications in olfactory perireceptor events. *Anat Rec (Hoboken)* 296, 1333–1345. doi:10.1002/ar.22735
- Hinds, J.W., Hinds, P.L., McNelly, N.A., 1984. An autoradiographic study of the mouse olfactory epithelium: evidence for long-lived receptors. *Anat. Rec.* 210, 375–383. doi:10.1002/ar.1092100213
- Hsia, A.Y., Vincent, J.-D., Lledo, P.-M., 1999. Dopamine Depresses Synaptic Inputs Into the Olfactory Bulb. *Journal of Neurophysiology* 82, 1082–1085.
- Hudson, R., Distel, H., 1998. Induced peripheral sensitivity in the developing vertebrate olfactory system. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 855, 109–115.
- Ikeda, K., Kageyama, R., Suzuki, Y., Kawakami, K., 2010. Six1 is indispensable for production of functional progenitor cells during olfactory epithelial development. *Int. J. Dev. Biol.* 54, 1453–1464. doi:10.1387/ijdb.093041ki
- Imai, T., Sakano, H., 2007. Roles of odorant receptors in projecting axons in the mouse olfactory system. *Curr. Opin. Neurobiol.* 17, 507–515. doi:10.1016/j.conb.2007.08.002
- Ingrand, J., 2012. La spectrométrie de masse et ses principales applications en biologie médicale. *Immuno-analyse & Biologie Spécialisée* 27, 47–53. doi:10.1016/j.immbio.2012.01.008

- Isaacson, J.S., 1999. Glutamate Spillover Mediates Excitatory Transmission in the Rat Olfactory Bulb. *Neuron* 23, 377–384. doi:10.1016/S0896-6273(00)80787-4
- Ishii, T., Serizawa, S., Kohda, A., Nakatani, H., Shiroishi, T., Okumura, K., Iwakura, Y., Nagawa, F., Tsuboi, A., Sakano, H., 2001. Monoallelic expression of the odourant receptor gene and axonal projection of olfactory sensory neurones. *Genes Cells* 6, 71–78.
- Iwema, C.L., Fang, H., Kurtz, D.B., Youngentob, S.L., Schwob, J.E., 2004. Odorant receptor expression patterns are restored in lesion-recovered rat olfactory epithelium. *J. Neurosci.* 24, 356–369. doi:10.1523/JNEUROSCI.1219-03.2004
- Jang, W., Youngentob, S.L., Schwob, J.E., 2003. Globose basal cells are required for reconstitution of olfactory epithelium after methyl bromide lesion. *J. Comp. Neurol.* 460, 123–140. doi:10.1002/cne.10642
- Jones, D.T., Reed, R.R., 1989. Golf: an olfactory neuron specific-G protein involved in odorant signal transduction. *Science* 244, 790–795. doi:10.1126/science.2499043
- Kanari, K., Kikusui, T., Takeuchi, Y., Mori, Y., 2005. Multidimensional structure of anxiety-related behavior in early-weaned rats. *Behavioural Brain Research* 156, 45–52. doi:10.1016/j.bbr.2004.05.008
- Katada, S., Hirokawa, T., Oka, Y., Suwa, M., Touhara, K., 2005. Structural basis for a broad but selective ligand spectrum of a mouse olfactory receptor: mapping the odorant-binding site. *J. Neurosci.* 25, 1806–1815. doi:10.1523/JNEUROSCI.4723-04.2005
- Kawakami, K., Takai-Kawakami, K., Okazaki, Y., Kurihara, H., Shimizu, Y., Yanaihara, T., 1997. The effect of odors on human newborn infants under stress. *Infant Behavior and Development* 20, 531–535. doi:10.1016/S0163-6383(97)90041-2
- Keil, W., von Stralendorff, F., Hudson, R., 1990. A behavioral bioassay for analysis of rabbit nipple-search pheromone. *Physiol. Behav.* 47, 525–529.
- Kerr, M.A., Belluscio, L., 2006. Olfactory experience accelerates glomerular refinement in the mammalian olfactory bulb. *Nat. Neurosci.* 9, 484–486. doi:10.1038/nn1673
- Khan, M., Vaes, E., Mombaerts, P., 2013. Temporal patterns of odorant receptor gene expression in adult and aged mice. *Molecular and Cellular Neuroscience* 57, 120–129. doi:10.1016/j.mcn.2013.08.001
- Kikusui, T., Nakamura, K., Kakuma, Y., Mori, Y., 2006. Early weaning augments neuroendocrine stress responses in mice. *Behavioural Brain Research* 175, 96–103. doi:10.1016/j.bbr.2006.08.007
- Kirsch, F., Beauchamp, J., Buettner, A., 2012. Time-dependent aroma changes in breast milk after oral intake of a pharmacological preparation containing 1,8-cineole. *Clinical Nutrition* 31, 682–692. doi:10.1016/j.clnu.2012.02.002
- Kirsch, F., Horst, K., Röhrig, W., Rychlik, M., Buettner, A., 2013. Tracing metabolite profiles in human milk: studies on the odorant 1,8-cineole transferred into breast milk after oral intake. *Metabolomics* 9, 483–496. doi:10.1007/s11306-012-0466-9
- Kobilka, B.K., Matsui, H., Kobilka, T.S., Yang-Feng, T.L., Francke, U., Caron, M.G., Lefkowitz, R.J., Regan, J.W., 1987. Cloning, sequencing, and expression of the gene coding for the human platelet alpha 2-adrenergic receptor. *Science* 238, 650–656. doi:10.1126/science.2823383
- Koffman, D.J., Petrov, E.S., Varlinskaya, E.I., Smotherman, W.P., 1998. Thermal, olfactory, and tactile stimuli increase oral grasping of an artificial nipple by the newborn rat. *Dev Psychobiol* 33, 317–326.

- Kondo, K., Suzukawa, K., Sakamoto, T., Watanabe, K., Kanaya, K., Ushio, M., Yamaguchi, T., Nibu, K.-I., Kaga, K., Yamasoba, T., 2010. Age-related changes in cell dynamics of the postnatal mouse olfactory neuroepithelium: Cell proliferation, neuronal differentiation, and cell death. *J. Comp. Neurol.* 518, 1962–1975. doi:10.1002/cne.22316
- Krautwurst, D., Yau, K.-W., Reed, R.R., 1998. Identification of Ligands for Olfactory Receptors by Functional Expression of a Receptor Library. *Cell* 95, 917–926. doi:10.1016/S0092-8674(00)81716-X
- Ladd CO, Owens MJ, Nemeroff CB, 1996. Persistent changes in corticotropin-releasing factor neuronal systems induced by maternal deprivation.: *Endocrinology*: Vol 137, No 4 [WWW Document]. URL <http://press.endocrine.org/doi/pdf/10.1210/endo.137.4.8625891> (accessed 12.9.16).
- Laska, M., Joshi, D., Shepherd, G.M., 2006. Olfactory sensitivity for aliphatic aldehydes in CD-1 mice. *Behavioural Brain Research* 167, 349–354. doi:10.1016/j.bbr.2005.09.022
- Lerch, S., Brandwein, C., Dormann, C., Gass, P., Chourbaji, S., 2014. What makes a good mother? Implication of inter-, and intrastrain strain “cross fostering” for emotional changes in mouse offspring. *Behavioural Brain Research* 274, 270–281. doi:10.1016/j.bbr.2014.08.021
- Lévai, O., Feistel, T., Breer, H., Strotmann, J., 2006. Cells in the vomeronasal organ express odorant receptors but project to the accessory olfactory bulb. *J. Comp. Neurol.* 498, 476–490. doi:10.1002/cne.21067
- Levine, S., 2005. Developmental determinants of sensitivity and resistance to stress. *Psychoneuroendocrinology* 30, 939–946. doi:10.1016/j.psyneuen.2005.03.013
- Lin, D.M., Wang, F., Lowe, G., Gold, G.H., Axel, R., Ngai, J., Brunet, L., 2000. Formation of Precise Connections in the Olfactory Bulb Occurs in the Absence of Odorant-Evoked Neuronal Activity. *Neuron* 26, 69–80. doi:10.1016/S0896-6273(00)81139-3
- Lin, D.Y., Zhang, S.-Z., Block, E., Katz, L.C., 2005. Encoding social signals in the mouse main olfactory bulb. *Nature* 434, 470–477. doi:10.1038/nature03414
- Liu, A., Savva, S., Urban, N.N., 2016. Early Odorant Exposure Increases the Number of Mitral and Tufted Cells Associated with a Single Glomerulus. *J. Neurosci.* 36, 11646–11653. doi:10.1523/JNEUROSCI.0654-16.2016
- Liu, Y.-J., Zhang, Y.-H., Li, L.-F., Du, R.-Q., Zhang, J.-H., Zhang, J.-X., 2016. Cross-Fostering of Male Mice Subtly Affects Female Olfactory Preferences. *PLOS ONE* 11, e0146662. doi:10.1371/journal.pone.0146662
- Liu, Caldji, Sharma, Plotsky, Meaney, 2000. Influence of Neonatal Rearing Conditions on Stress-Induced Adrenocorticotropin Responses and Norepinephrine Release in the Hypothalamic Paraventricular Nucleus. *Journal of Neuroendocrinology* 12, 5–12. doi:10.1046/j.1365-2826.2000.00422.x
- Lodovichi, C., Belluscio, L., Katz, L.C., 2003. Functional Topography of Connections Linking Mirror-Symmetric Maps in the Mouse Olfactory Bulb. *Neuron* 38, 265–276. doi:10.1016/S0896-6273(03)00194-6
- Logan, D.W., Brunet, L.J., Webb, W.R., Cutforth, T., Ngai, J., Stowers, L., 2012. Learned recognition of maternal signature odors mediates the first suckling episode in mice. *Curr. Biol.* 22, 1998–2007. doi:10.1016/j.cub.2012.08.041
- Loo, A.T., Youngentob, S.L., Kent, P.F., Schwob, J.E., 1996. The aging olfactory epithelium: neurogenesis, response to damage, and odorant-induced activity. *Int. J. Dev. Neurosci.* 14, 881–900.



- Luchetti, A., Oddi, D., Lampis, V., Centofante, E., Felsani, A., Battaglia, M., D'Amato, F.R., 2015. Early handling and repeated cross-fostering have opposite effect on mouse emotionality. *Front. Behav. Neurosci.* 9. doi:10.3389/fnbeh.2015.00093
- Luo, M., Fee, M.S., Katz, L.C., 2003. Encoding pheromonal signals in the accessory olfactory bulb of behaving mice. *Science* 299, 1196–1201. doi:10.1126/science.1082133
- Ma, L., Wu, Y., Qiu, Q., Scheerer, H., Moran, A., Yu, C.R., 2014. A Developmental Switch of Axon Targeting in the Continuously Regenerating Mouse Olfactory System. *Science* 344, 194–197. doi:10.1126/science.1248805
- Mackay-Sim, A., Kittel, P.W., 1991. On the Life Span of Olfactory Receptor Neurons. *European Journal of Neuroscience* 3, 209–215. doi:10.1111/j.1460-9568.1991.tb00081.x
- Malnic, B., Godfrey, P.A., Buck, L.B., 2004. The human olfactory receptor gene family. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101, 2584–2589.
- Malnic, B., Hirono, J., Sato, T., Buck, L.B., 1999. Combinatorial Receptor Codes for Odors. *Cell* 96, 713–723. doi:10.1016/S0092-8674(00)80581-4
- Malun, D., Brunjes, P.C., 1996. Development of olfactory glomeruli: Temporal and spatial interactions between olfactory receptor axons and mitral cells in opossums and rats. *J. Comp. Neurol.* 368, 1–16. doi:10.1002/(SICI)1096-9861(19960422)368:1<::AID-CNE1>3.0.CO;2-7
- Mamasuew, K., Breer, H., Fleischer, J., 2008. Grueneberg ganglion neurons respond to cool ambient temperatures. *Eur. J. Neurosci.* 28, 1775–1785. doi:10.1111/j.1460-9568.2008.06465.x
- Mamasuew, K., Hofmann, N., Breer, H., Fleischer, J., 2011. Grueneberg ganglion neurons are activated by a defined set of odorants. *Chem. Senses* 36, 271–282. doi:10.1093/chemse/bjq124
- Man, O., Gilad, Y., Lancet, D., 2004. Prediction of the odorant binding site of olfactory receptor proteins by human-mouse comparisons. *Protein Sci.* 13, 240–254. doi:10.1110/ps.03296404
- Mandaïron, N., Poncelet, J., Bensafi, M., Didier, A., 2009a. Humans and Mice Express Similar Olfactory Preferences. *PLoS ONE* 4. doi:10.1371/journal.pone.0004209
- Margarit, T., Lancet, D., 1993. Expression of olfactory receptor and transduction genes during rat development. *Developmental Brain Research* 73, 7–16. doi:10.1016/0165-3806(93)90040-H
- Marlier, L., Schaal, B., 2005. Human newborns prefer human milk: conspecific milk odor is attractive without postnatal exposure. *Child Dev* 76, 155–168. doi:10.1111/j.1467-8624.2005.00836.x
- Marlier, L., Schaal, B., Gaugler, C., Messer, J., 2001. Olfaction in Premature Human Newborns: Detection and Discrimination Abilities Two Months Before Gestational Term, in: Marchlewska-Koj, A., Lepri, J.J., Müller-Schwarze, D. (Eds.), *Chemical Signals in Vertebrates* 9. Springer US, pp. 205–209.
- Marlier, L., Schaal, B., Soussignan, R., 1998a. Neonatal responsiveness to the odor of amniotic and lacteal fluids: a test of perinatal chemosensory continuity. *Child Dev* 69, 611–623.
- Marlier Luc, Schaal Benoist, 1997. Familiarité et discrimination olfactive chez le nouveau-né : influence différentielle du mode d'alimentation ?
- Marlier Luc, Schaal Benoist, Soussignan Robert, 1998b. Bottle-Fed Neonates Prefer an Odor Experienced in Utero to an Odor Experienced Postnatally in the Feeding Context.
- Marshall, D.A., Maruniak, J.A., 1986. Masera's organ responds to odorants. *Brain Res.* 366, 329–332.

- Matsukawa, M., Imada, M., Aizawa, S., Sato, T., 2016. Habitat odor can alleviate innate stress responses in mice. *Brain Research* 1631, 46–52. doi:10.1016/j.brainres.2015.11.020
- McEwen, B.S., Kloet, E.R.D., Rostene, W., 1986. Adrenal steroid receptors and actions in the nervous system. *Physiological Reviews* 66, 1121–1188.
- Meaney, M.J., Mitchell, J.B., Aitken, D.H., Bhatnagar, S., Bodnoff, S.R., Iny, L.J., Sarrieau, A., 1991. The effects of neonatal handling on the development of the adrenocortical response to stress: Implications for neuropathology and cognitive deficits in later life. *Psychoneuroendocrinology* 16, 85–103. doi:10.1016/0306-4530(91)90072-2
- Menco, B.P.M., Morrison, E.E., 2003. Morphology of the mammalian olfactory epithelium: form, fine structure, function, and pathology. *NEUROLOGICAL DISEASE AND THERAPY* 57, 17–50.
- Mennella, J.A., Beauchamp, G.K., 1999. Experience with a flavor in mother's milk modifies the infant's acceptance of flavored cereal. *Dev Psychobiol* 35, 197–203.
- Mennella, J.A., Beauchamp, G.K., Oct 1991a. Maternal diet alters the sensory qualities of human milk and the nursing's behavior. *Pediatrics* 88, 737–744.
- Mennella, J.A., Jagnow, C.P., Beauchamp, G.K., 2001. Prenatal and postnatal flavor learning by human infants. *Pediatrics* 107, E88.
- Mennella, J.A., Johnson, A., Beauchamp, G.K., 1995. Garlic ingestion by pregnant women alters the odor of amniotic fluid. *Chem. Senses* 20, 207–209.
- Mennella Julie A ; Beauchamp Gary K, 1991b. The transfer of alcohol to human milk : effects on flavor and the infant's behavior. *The New England Journal of Medicine*.
- Mizuno, K., Mizuno, N., Shinohara, T., Noda, M., 2004. Mother-infant skin-to-skin contact after delivery results in early recognition of own mother's milk odour. *Acta Paediatr.* 93, 1640–1645.
- Mizuno, K., Ueda, A., 2004. Antenatal olfactory learning influences infant feeding. *Early Human Development* 76, 83–90. doi:10.1016/j.earlhumdev.2003.10.003
- Mombaerts, P., 2006. Axonal Wiring in the Mouse Olfactory System. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 22, 713–737. doi:10.1146/annurev.cellbio.21.012804.093915
- Mombaerts, P., 2004. Odorant receptor gene choice in olfactory sensory neurons: the one receptor-one neuron hypothesis revisited. *Curr. Opin. Neurobiol.* 14, 31–36. doi:10.1016/j.conb.2004.01.014
- Mombaerts, P., 2001. How smell develops. *Nat Neurosci* 4, 1192–1198. doi:10.1038/nn751
- Mombaerts, P., 1999. Seven-transmembrane proteins as odorant and chemosensory receptors. *Science* 286, 707–711.
- Mombaerts, P., Wang, F., Dulac, C., Chao, S.K., Nemes, A., Mendelsohn, M., Edmondson, J., Axel, R., Nov 15, 1996a. Visualizing an olfactory sensory map. *Cell* 87, 675–686.
- Mori, K., Takahashi, Y.K., Igarashi, K.M., Yamaguchi, M., 2006. Maps of Odorant Molecular Features in the Mammalian Olfactory Bulb. *Physiological Reviews* 86, 409–433. doi:10.1152/physrev.00021.2005
- Murdoch, B., DelConte, C., García-Castro, M.I., 2010. Embryonic Pax7-expressing progenitors contribute multiple cell types to the postnatal olfactory epithelium. *J. Neurosci.* 30, 9523–9532. doi:10.1523/JNEUROSCI.0867-10.2010
- Nagayama, S., Homma, R., Imamura, F., 2014. Neuronal organization of olfactory bulb circuits. *Front Neural Circuits* 8, 98. doi:10.3389/fncir.2014.00098
- Nakahara, T.S., Cardozo, L.M., Ibarra-Soria, X., Bard, A.D., Carvalho, V.M.A., Trintinalia, G.Z., Logan, D.W., Papes, F., 2016. Detection of pup odors by non-canonical adult vomeronasal neurons expressing an odorant receptor gene is influenced by sex and

- parenting status. *BMC Biol* 14. doi:10.1186/s12915-016-0234-9
- Nakamura, T., Gold, G.H., 1987. A cyclic nucleotide-gated conductance in olfactory receptor cilia. *Nature* 325, 442–444. doi:10.1038/325442a0
- Nakashima, T., Akamatsu, M., Hatanaka, A., Kiyohara, T., 2004. Attenuation of stress-induced elevations in plasma ACTH level and body temperature in rats by green odor. *Physiology & Behavior* 80, 481–488. doi:10.1016/j.physbeh.2003.10.008
- Nakatani, H., Serizawa, S., Nakajima, M., Imai, T., Sakano, H., 2003. Developmental elimination of ectopic projection sites for the transgenic OR gene that has lost zone specificity in the olfactory epithelium. *European Journal of Neuroscience* 18, 2425–2432. doi:10.1046/j.1460-9568.2003.02998.x
- Ngai, J., Chess, A., Dowling, M.M., Neclles, N., Macagno, E.R., Axel, R., 1993. Coding of olfactory information: Topography of odorant receptor expression in the catfish olfactory epithelium. *Cell* 72, 667–680. doi:10.1016/0092-8674(93)90396-8
- Nicolay, D.J., Doucette, J.R., Nazarali, A.J., 2006. Transcriptional regulation of neurogenesis in the olfactory epithelium. *Cell. Mol. Neurobiol.* 26, 803–821. doi:10.1007/s10571-006-9058-4
- Nicoll, R.A., 1971. Pharmacological evidence for GABA as the transmitter in granule cell inhibition in the olfactory bulb. *Brain Research* 35, 137–149. doi:10.1016/0006-8993(71)90600-7
- Nishitani, S., Miyamura, T., Tagawa, M., Sumi, M., Takase, R., Doi, H., Moriuchi, H., Shinohara, K., 2009. The calming effect of a maternal breast milk odor on the human newborn infant. *Neurosci. Res.* 63, 66–71. doi:10.1016/j.neures.2008.10.007
- Nolte, D.L., Mason, J.R., 1995. Maternal ingestion of ortho-aminoacetophenone during gestation affects intake by offspring. *Physiol. Behav.* 58, 925–928.
- Nolte, D.L., Provenza, F.D., Callan, R., Panter, K.E., 1992. Garlic in the ovine fetal environment. *Physiology & Behavior* 52, 1091–1093. doi:10.1016/0031-9384(92)90464-D
- Ohta, Y., Takanosawa, M., Matumoto, C., Makino, N., Ishimoto, S., Ichimura, K., 2002. High-dose glucocorticoids inhibit proliferation of rat olfactory epithelium. *Ann. Otol. Rhinol. Laryngol.* 111, 909–911.
- Olender, T., Lancet, D., Nebert, D.W., 2008. Update on the olfactory receptor (OR) gene superfamily. *Human Genomics* 3, 87. doi:10.1186/1479-7364-3-1-87
- Oliva, A.M., Jones, K.R., Restrepo, D., 2008. Sensory-dependent asymmetry for a urine-responsive olfactory bulb glomerulus. *J. Comp. Neurol.* 510, 475–483. doi:10.1002/cne.21800
- Oostindjer, M., Bolhuis, J.E., Simon, K., van den Brand, H., Kemp, B., 2011. Perinatal flavour learning and adaptation to being weaned: all the pig needs is smell. *PLoS ONE* 6, e25318. doi:10.1371/journal.pone.0025318
- Ottoson, D., 1955. Analysis of the electrical activity of the olfactory epithelium. *Acta Physiol Scand Suppl* 35, 1–83.
- Palouzier-Paulignan, B., Lacroix, M.-C., Aimé, P., Baly, C., Caillol, M., Congar, P., Julliard, A.K., Tucker, K., Fadool, D.A., 2012. Olfaction Under Metabolic Influences. *Chem Senses* 37, 769–797. doi:10.1093/chemse/bjs059
- Papet Yves, Brunet Bertrand, Mura Patrick, 2010. Headspace (HS) et micro-extraction en phase solide (SPME). Théorie et applications Headspace (HS) and solid phase micro-extraction (SPME). Theory and applications [WWW Document]. URL [https://www.researchgate.net/publication/46378946\\_Headspace\\_HS\\_et\\_micro-extraction\\_en\\_phase\\_solide\\_SPME\\_Theorie\\_et\\_applications\\_Headspace\\_HS\\_and\\_sol](https://www.researchgate.net/publication/46378946_Headspace_HS_et_micro-extraction_en_phase_solide_SPME_Theorie_et_applications_Headspace_HS_and_sol)

- id\_phase\_micro-extraction\_SPME\_Theory\_and\_applications (accessed 1.12.17).
- Parfet, K.A., Gonyou, H.W., 1991. Attraction of newborn piglets to auditory, visual, olfactory and tactile stimuli. *J. Anim. Sci.* 69, 125–133.
- Pataramekin, P.P., Meisami, E., 2005. Cytochrome oxidase staining reveals functionally important activity bands in the olfactory epithelium of newborn rat. *J. Neurocytol.* 34, 257–268. doi:10.1007/s11068-005-8357-x
- Pedersen, P.E., Blass, E.M., 1982. Prenatal and postnatal determinants of the 1st suckling episode in albino rats. *Dev. Psychobiol.* 15, 349–355. doi:10.1002/dev.420150407
- Petzold, G.C., Albeanu, D.F., Sato, T.F., Murthy, V.N., 2008. Coupling of Neural Activity to Blood Flow in Olfactory Glomeruli Is Mediated by Astrocytic Pathways. *Neuron* 58, 897–910. doi:10.1016/j.neuron.2008.04.029
- Pihet, S., Mellier, D., Bullinger, A., Schaal, B., 1997. Réponses comportementales aux odeurs chez le nouveau-né prématuré: étude préliminaire. *Enfance* 50, 33–46. doi:10.3406/enfan.1997.3044
- Pinching, A.J., Powell, T.P., Sep 1971a. The neuron types of the glomerular layer of the olfactory bulb. *J. Cell. Sci.* 9, 305–345.
- Pinching, A.J., Powell, T.P., Sep 1971b. The neuropil of the glomeruli of the olfactory bulb. *J. Cell. Sci.* 9, 347–377.
- Pixley, S.K., Farbman, A.I., Menco, B.P., 1997. Monoclonal antibody marker for olfactory sustentacular cell microvilli. *Anat. Rec.* 248, 307–321.
- Pomeroy, S.L., LaMantia, A.S., Purves, D., 1990. Postnatal construction of neural circuitry in the mouse olfactory bulb. *J. Neurosci.* 10, 1952–1966.
- Potter, S.M., Zheng, C., Koos, D.S., Feinstein, P., Fraser, S.E., Mombaerts, P., 2001. Structure and Emergence of Specific Olfactory Glomeruli in the Mouse. *J Neurosci* 21, 9713–9723.
- Price, J.L., Powell, T.P., 1970. The mitral and short axon cells of the olfactory bulb. *J. Cell. Sci.* 7, 631–651.
- Priebe, K., Brake, W.G., Romeo, R.D., Sisti, H.M., Mueller, A., McEwen, B.S., Francis, D.D., 2005. Maternal influences on adult stress and anxiety-like behavior in C57BL/6J and BALB/cJ mice: A cross-fostering study. *Dev. Psychobiol.* 47, 398–407. doi:10.1002/dev.20098
- Pritchard JA, 1965. Deglutition by Normal and Anencephalic Fetuses.: *Obstetrics & Gynecology* [WWW Document]. LWW. URL [http://journals.lww.com/greenjournal/Fulltext/1965/03000/Deglutition\\_by\\_Normal\\_and\\_Anencephalic\\_Fetuses\\_.1.aspx](http://journals.lww.com/greenjournal/Fulltext/1965/03000/Deglutition_by_Normal_and_Anencephalic_Fetuses_.1.aspx) (accessed 10.3.16).
- Prut, L., Belzung, C., 2003. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. *European Journal of Pharmacology, Animal Models of Anxiety Disorders* 463, 3–33. doi:10.1016/S0014-2999(03)01272-X
- Pyatkina Ga, 1981. Development of the olfactory epithelium in man. *Z Mikrosk Anat Forsch* 96, 361–372.
- Rattaz, C., Goubet, N., Bullinger, A., 2005. The calming effect of a familiar odor on full-term newborns. *J Dev Behav Pediatr* 26, 86–92.
- Ravi, N., Sanchez-Guardado, L., Lois, C., Kelsch, W., 2016. Determination of the connectivity of newborn neurons in mammalian olfactory circuits. *Cell. Mol. Life Sci.* 1–19. doi:10.1007/s00018-016-2367-y
- Raynaud, A., Meunier, N., Acquistapace, A., Bombail, V., 2015. Chronic variable stress exposure in male Wistar rats affects the first step of olfactory detection. *Behavioural Brain Research* 291, 36–45. doi:10.1016/j.bbr.2015.05.013

- Reisert, J., 2010. Origin of basal activity in mammalian olfactory receptor neurons. *The Journal of General Physiology* 136, 529–540. doi:10.1085/jgp.201010528
- Ressler, K.J., Sullivan, S.L., Buck, L.B., 1994. Information coding in the olfactory system: evidence for a stereotyped and highly organized epitope map in the olfactory bulb. *Cell* 79, 1245–1255.
- Ressler, K.J., Sullivan, S.L., Buck, L.B., 1993. A zonal organization of odorant receptor gene expression in the olfactory epithelium. *Cell* 73, 597–609. doi:10.1016/0092-8674(93)90145-G
- Robinson, A.M., Kern, R.C., Foster, J.D., Fong, K.J., Pitovski, D.Z., 1998. Expression of glucocorticoid receptor mRNA and protein in the olfactory mucosa: Physiologic and pathophysiologic implications. *The Laryngoscope* 108, 1238–1242. doi:10.1097/00005537-199808000-00026
- Rodriguez, I., 2004. Pheromone receptors in mammals. *Horm Behav* 46, 219–230. doi:10.1016/j.yhbeh.2004.03.014
- Roi Phillippe, Girard Tristan, Forest Jean-Daniel , Holley André, 2013. La Théorie Sensorielle | La comptabilité et le système olfactif [WWW Document]. URL <http://www.theoriesensorielle.com/analogie-entre-le-systeme-comptable-urukeen-et-le-systeme-olfactif/> (accessed 12.5.16).
- Rosenblatt, J.S., and Lehrman, D.S., 1963. Maternal behavior in the laboratory rat. *Maternal Behavior in Mammals*.
- Royal, S.J., Key, B., 1999. Development of P2 Olfactory Glomeruli in P2-Internal Ribosome Entry Site-Tau-LacZ Transgenic Mice. *J. Neurosci.* 19, 9856–9864.
- Royet, J.P., Souchier, C., Jourdan, F., Ploye, H., 1988. Morphometric study of the glomerular population in the mouse olfactory bulb: numerical density and size distribution along the rostrocaudal axis. *J. Comp. Neurol.* 270, 559–568. doi:10.1002/cne.902700409
- Rubin, B.D., Katz, L.C., 1999. Optical Imaging of Odorant Representations in the Mammalian Olfactory Bulb. *Neuron* 23, 499–511. doi:10.1016/S0896-6273(00)80803-X
- Saito, H., Mimmack, M., Kishimoto, J., Keverne, E.B., Emson, P.C., 1998. Expression of olfactory receptors, G-proteins and AxCAMs during the development and maturation of olfactory sensory neurons in the mouse. *Brain Res. Dev. Brain Res.* 110, 69–81.
- Samsonova, E.V., Krause, P., Bäck, T., IJzerman, A.P., 2007. Characteristic amino acid combinations in olfactory G protein-coupled receptors. *Proteins* 67, 154–166. doi:10.1002/prot.21112
- Saraiva, L.R., Kondoh, K., Ye, X., Yoon, K., Hernandez, M., Buck, L.B., 2016. Combinatorial effects of odorants on mouse behavior. *PNAS* 113, E3300–E3306. doi:10.1073/pnas.1605973113
- Sarnat, H.B., 1978. Olfactory reflexes in the newborn infant. *J. Pediatr.* 92, 624–626.
- Schaal, B., 1997. L'olfaction: développement de la fonction et fonctions au cours du développement. *Enfance* 50, 5–20. doi:10.3406/enfan.1997.3041
- Schaal, B., Marlier, L., Soussignan, R., 2000. Human fetuses learn odours from their pregnant mother's diet. *Chem. Senses* 25, 729–737.
- Schaal, B., Marlier, L., Soussignan, R., 1998. Olfactory function in the human fetus: evidence from selective neonatal responsiveness to the odor of amniotic fluid. *Behav. Neurosci.* 112, 1438–1449.
- Schaal, B., Marlier, L., Soussignan, R., 1995c. Responsiveness to the odour of amniotic fluid in the human neonate. *Biol. Neonate* 67, 397–406.
- Schaal, B., Orgeur, P., Rognon, C., 1995b. Odor sensing in the human fetus: Anatomical, functional, and chemoecological bases, in: -P, J., Fifer, W.P., Krasnegor, N.A.,

- Smotherman, W.P. (Eds.), *Fetal Development: A Psychobiological Perspective*. Lawrence Erlbaum Associates, Inc, Hillsdale, NJ, US, pp. 205–237.
- Schaeffer, J.P., 1910. The lateral wall of the cavum nasi in man, with especial reference to the various developmental stages. *J. Morphol.* 21, 613–707. doi:10.1002/jmor.1050210405
- Schall Benoit, Orgeur Pierre and Arnould Cécile, 1995a. Olfactory preferences in newborn lambs : possible influence of prenatal experience.
- Scheffler, L., Sauermann, Y., Zeh, G., Hauf, K., Heinlein, A., Sharapa, C., Buettner, A., 2016. Detection of Volatile Metabolites of Garlic in Human Breast Milk. *Metabolites* 6. doi:10.3390/metabo6020018
- Schild, D., Restrepo, D., 1998. Transduction mechanisms in vertebrate olfactory receptor cells. *Physiol. Rev.* 78, 429–466.
- Schwanzel-Fukuda, M., Pfaff, D.W., 1989. Origin of luteinizing hormone-releasing hormone neurons. *Nature* 338, 161–164. doi:10.1038/338161a0
- Schwarzenbacher, K., Fleischer, J., Breer, H., 2005. Formation and maturation of olfactory cilia monitored by odorant receptor-specific antibodies. *Histochem Cell Biol* 123, 419–428. doi:10.1007/s00418-005-0790-5
- Schwob, J.E., 2005. Restoring olfaction: a view from the olfactory epithelium. *Chem. Senses* 30 Suppl 1, i131-132. doi:10.1093/chemse/bjh149
- Schwob, J.E., 2002. Neural regeneration and the peripheral olfactory system. *Anat. Rec.* 269, 33–49. doi:10.1002/ar.10047
- Schwob, J.E., Huard, J.M., Luskin, M.B., Youngentob, S.L., 1994. Retroviral lineage studies of the rat olfactory epithelium. *Chem. Senses* 19, 671–682.
- Schwob, J.E., Youngentob, S.L., Mezza, R.C., 1995. Reconstitution of the rat olfactory epithelium after methyl bromide-induced lesion. *J. Comp. Neurol.* 359, 15–37. doi:10.1002/cne.903590103
- Schwob, J.E., Youngentob, S.L., Ring, G., Iwema, C.L., Mezza, R.C., 1999. Reinnervation of the rat olfactory bulb after methyl bromide-induced lesion: timing and extent of reinnervation. *J. Comp. Neurol.* 412, 439–457.
- Scott, J.W., Brierley, T., 1999. A Functional Map in Rat Olfactory Epithelium. *Chem Senses* 24, 679–690. doi:10.1093/chemse/24.6.679
- Semke, E., Distel, H., Hudson, R., 1995. Specific enhancement of olfactory receptor sensitivity associated with foetal learning of food odors in the rabbit. *Naturwissenschaften* 82, 148–149. doi:10.1007/BF01177279
- Shaker, T., Dennis, D., Kurrasch, D.M., Schuurmans, C., 2012. Neurog1 and Neurog2 coordinately regulate development of the olfactory system. *Neural Dev* 7, 28. doi:10.1186/1749-8104-7-28
- Shepherd Gordon M., 2003. *The Synaptic Organization of the Brain*. Oxford University Press.
- Shibata, H., Nagasaka, T., 1982. Contribution of Nonshivering Thermogenesis to Stress-induced Hyperthermia in Rats. *The Japanese Journal of Physiology* 32, 991–995. doi:10.2170/jjphysiol.32.991
- Shibuya, T., 1960. The electrical responses of the olfactory epithelium of some fishes. *Jpn. J. Physiol.* 10, 317–326.
- Simitzis, P.E., Deligeorgis, S.G., Bizelis, J.A., Fegeros, K., 2008. Feeding preferences in lambs influenced by prenatal flavour exposure. *Physiol. Behav.* 93, 529–536. doi:10.1016/j.physbeh.2007.10.013
- Smart, I.H., 1971. Location and orientation of mitotic figures in the developing mouse olfactory epithelium. *J. Anat.* 109, 243–251.
- Smotherman, W.P., 1982a. In utero chemosensory experience alters taste preferences and corticosterone responsiveness. *Behavioral and Neural Biology* 36, 61–68.

doi:10.1016/S0163-1047(82)90245-X

- Smotherman, W.P., Robinson, S.R., 1990. Rat fetuses respond to chemical stimuli in gas phase. *Physiology & Behavior* 47, 863–868. doi:10.1016/0031-9384(90)90010-2
- Soussignan, R., Schaal, B., Marlier, L., Jiang, T., 1997. Facial and autonomic responses to biological and artificial olfactory stimuli in human neonates: re-examining early hedonic discrimination of odors. *Physiol. Behav.* 62, 745–758.
- Sreng, L., Temime-Roussel, B., Wortham, H., Mourre, C., 2016. Chemical Identification of “Maternal Signature Odors” in Rat. *Chem. Senses* bjw124. doi:10.1093/chemse/bjw124
- Stirnemann F, 1936. Le goût et l’odorat du nouveau-né. *Revue française de pédiatrie* 453–485.
- Strotmann, J., Levai, O., Fleischer, J., Schwarzenbacher, K., Breer, H., 2004. Olfactory receptor proteins in axonal processes of chemosensory neurons. *J. Neurosci.* 24, 7754–7761. doi:10.1523/JNEUROSCI.2588-04.2004
- Strotmann, J., Wanner, I., Helfrich, T., Beck, A., Meinken, C., Kubick, S., Breer, H., 1994. Olfactory neurones expressing distinct odorant receptor subtypes are spatially segregated in the nasal neuroepithelium. *Cell Tissue Res.* 276, 429–438.
- Strotmann, J., Wanner, I., Krieger, J., Raming, K., Breer, H., 1992. Expression of odorant receptors in spatially restricted subsets of chemosensory neurones. *Neuroreport* 3, 1053–1056.
- Suárez, R., García-González, D., de Castro, F., 2012. Mutual influences between the main olfactory and vomeronasal systems in development and evolution. *Front Neuroanat* 6, 50. doi:10.3389/fnana.2012.00050
- Sullivan, R.M., Toubas, P., 1998. Clinical usefulness of maternal odor in newborns: soothing and feeding preparatory responses. *Biol. Neonate* 74, 402–408.
- Sullivan, S.L., Ressler, K.J., Buck, L.B., 1995. Spatial patterning and information coding in the olfactory system. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 5, 516–523.
- Suzuki, Y., Takeda, M., Farbman, A.I., 1996. Supporting cells as phagocytes in the olfactory epithelium after bullectomy. *J. Comp. Neurol.* 376, 509–517. doi:10.1002/(SICI)1096-9861(19961223)376:4<509::AID-CNE1>3.0.CO;2-5
- Takagi, S.F., Shibuya, T., 1960. The electrical activity of the olfactory epithelium studied with micro- and macro-electrodes. *Jpn. J. Physiol.* 10, 385–395.
- Tan, L., Li, Q., Xie, X.S., 2015. Olfactory sensory neurons transiently express multiple olfactory receptors during development. *Mol Syst Biol* 11. doi:10.15252/msb.20156639
- Teicher, M.H., Blass, E.M., 1977. First suckling response of the newborn albino rat: the roles of olfaction and amniotic fluid. *Science* 198, 635–636.
- Todrank, J., Heth, G., Restrepo, D., 2011. Effects of in utero odorant exposure on neuroanatomical development of the olfactory bulb and odour preferences. *Proc. Biol. Sci.* 278, 1949–1955. doi:10.1098/rspb.2010.2314
- Treloar, H.B., Feinstein, P., Mombaerts, P., Greer, C.A., 2002. Specificity of glomerular targeting by olfactory sensory axons. *J. Neurosci.* 22, 2469–2477. doi:20026239
- Treloar, H.B., Miller, A.M., Ray, A., Greer, C.A., 2010. Development of the Olfactory System, in: Menini, A. (Ed.), *The Neurobiology of Olfaction*, *Frontiers in Neuroscience*. CRC Press/Taylor & Francis, Boca Raton (FL).
- Treloar, H.B., Purcell, A.L., Greer, C.A., 1999. Glomerular formation in the developing rat olfactory bulb. *J. Comp. Neurol.* 413, 289–304. doi:10.1002/(SICI)1096-9861(19991018)413:2<289::AID-CNE9>3.0.CO;2-U

- Trinh, K., Storm, D.R., 2003. Vomeronasal organ detects odorants in absence of signaling through main olfactory epithelium. *Nat. Neurosci.* 6, 519–525. doi:10.1038/nn1039
- Uchida, N., Takahashi, Y.K., Tanifuji, M., Mori, K., 2000. Odor maps in the mammalian olfactory bulb: domain organization and odorant structural features. *Nat Neurosci* 3, 1035–1043. doi:10.1038/79857
- Valle-Leija, P., 2015. Odorant receptors signaling instructs the development and plasticity of the glomerular map. *Neural Plast.* 2015, 975367. doi:10.1155/2015/975367
- Valle-Leija, P., Blanco-Hernández, E., Drucker-Colín, R., Gutiérrez-Ospina, G., Vidaltamayo, R., 2012. Supernumerary formation of olfactory glomeruli induced by chronic odorant exposure: a constructivist expression of neural plasticity. *PLoS ONE* 7, e35358. doi:10.1371/journal.pone.0035358
- Valverde, F., Heredia, M., Santacana, M., 1993. Characterization of neuronal cell varieties migrating from the olfactory epithelium during prenatal development in the rat. Immunocytochemical study using antibodies against olfactory marker protein (OMP) and luteinizing hormone-releasing hormone (LH-RH). *Brain Res. Dev. Brain Res.* 71, 209–220.
- Valverde, F., Santacana, M., Heredia, M., 1992. Formation of an olfactory glomerulus: morphological aspects of development and organization. *Neuroscience* 49, 255–275.
- Van Der Veen, R., Abrous, D.N., Ronald de Kloet, E., Piazza, P.V., Koehl, M., 2008. Impact of intra- and interstrain cross-fostering on mouse maternal care. *Genes, Brain and Behavior* 7, 184–192. doi:10.1111/j.1601-183X.2007.00337.x
- Varendi, H., Christensson, K., Porter, R.H., Winberg, J., 1998. Soothing effect of amniotic fluid smell in newborn infants. *Early Human Development* 51, 47–55. doi:10.1016/S0378-3782(97)00082-0
- Vassar, R., Chao, S.K., Sitcheran, R., Nuñez, J.M., Vosshall, L.B., Axel, R., 1994. Topographic organization of sensory projections to the olfactory bulb. *Cell* 79, 981–991.
- Wachowiak, M., Shipley, M.T., 2006. Coding and synaptic processing of sensory information in the glomerular layer of the olfactory bulb. *Seminars in Cell & Developmental Biology, OlfactionAnimal Stem Cell Types* 17, 411–423. doi:10.1016/j.semcd.2006.04.007
- Wang, F., Nemes, A., Mendelsohn, M., Axel, R., 1998. Odorant receptors govern the formation of a precise topographic map. *Cell* 93, 47–60.
- Wang, H.-W., Wysocki, C.J., Gold, G.H., 1994. Induction of Olfactory Receptor Sensitivity in Mice, in: D.S, K.K., D.S, N.S., D.M.S, H.O.M.D. (Eds.), *Olfaction and Taste XI*. Springer Japan, pp. 240–240.
- Watt, W.C., Sakano, H., Lee, Z.-Y., Reusch, J.E., Trinh, K., Storm, D.R., 2004. Odorant stimulation enhances survival of olfactory sensory neurons via MAPK and CREB. *Neuron* 41, 955–967.
- Wisden, W., Laurie, D.J., Monyer, H., Seeburg, P.H., 1992. The distribution of 13 GABAA receptor subunit mRNAs in the rat brain. I. Telencephalon, diencephalon, mesencephalon. *J. Neurosci.* 12, 1040–1062.
- Würbel, H., Stauffacher, M., 1997. Age and weight at weaning affect corticosterone level and development of stereotypies in ICR-mice. *Animal Behaviour* 53, 891–900. doi:10.1006/anbe.1996.0424



- Ying, N., Tian, J., Yu, S., Zhou, J., Ling, S., Xia, L., Ye, X., 2012. Progress in defining heterogeneity and modeling periglomerular cells in the olfactory bulb. *Sci. China Life Sci.* 55, 567–575. doi:10.1007/s11427-012-4346-3
- Yoon, H., Enquist, L.W., Dulac, C., 2005. Olfactory Inputs to Hypothalamic Neurons Controlling Reproduction and Fertility. *Cell* 123, 669–682. doi:10.1016/j.cell.2005.08.039
- Yu, C.R., Wu, Y., 2016. Regeneration and rewiring of rodent olfactory sensory neurons. *Exp. Neurol.* doi:10.1016/j.expneurol.2016.06.001
- Zhang, X., Firestein, S., 2002. The olfactory receptor gene superfamily of the mouse. *Nat. Neurosci.* 5, 124–133. doi:10.1038/nn800
- Zhang, X., Rogers, M., Tian, H., Zhang, X., Zou, D.-J., Liu, J., Ma, M., Shepherd, G.M., Firestein, S.J., 2004. High-throughput microarray detection of olfactory receptor gene expression in the mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 14168–14173. doi:10.1073/pnas.0405350101
- Zhang, X., Zhang, X., Firestein, S., 2007. Comparative genomics of odorant and pheromone receptor genes in rodents. *Genomics* 89, 441–450. doi:10.1016/j.ygeno.2007.01.002
- Zhao, H., Ivic, L., Otaki, J.M., Hashimoto, M., Mikoshiba, K., Firestein, S., 1998. Functional Expression of a Mammalian Odorant Receptor. *Science* 279, 237–242. doi:10.1126/science.279.5348.237
- Zheng, C., Feinstein, P., Bozza, T., Rodriguez, I., Mombaerts, P., 2000. Peripheral Olfactory Projections Are Differentially Affected in Mice Deficient in a Cyclic Nucleotide-Gated Channel Subunit. *Neuron* 26, 81–91. doi:10.1016/S0896-6273(00)81140-X
- Zou, D.-J., Chesler, A., Firestein, S., 2009. How the olfactory bulb got its glomeruli: a just so story? *Nat Rev Neurosci* 10, 611–618. doi:10.1038/nrn2666
- Zou, D.-J., Feinstein, P., Rivers, A.L., Mathews, G.A., Kim, A., Greer, C.A., Mombaerts, P., Firestein, S., 2004. Postnatal refinement of peripheral olfactory projections. *Science* 304, 1976–1979. doi:10.1126/science.1093468
- Zufall, F., Leinders-Zufall, T., 2000. The Cellular and Molecular Basis of Odor Adaptation. *Chem. Senses* 25, 473–481. doi:10.1093/chemse/25.4.473
- Zupko, K., Poria, Y., Lancet, D., 1991. Immunolocalization of cytochromes P-450olf1 and P-450olf2 in rat olfactory mucosa. *Eur. J. Biochem.* 196, 51–58.

**Titre : Effet d'une exposition odorante pré et post-natale sur le développement des préférences médiées par l'olfaction chez la souris - Mécanismes de neuromodulation**

**Mots clés :** Olfaction ; exposition odorante ; périnatal ; système olfactif ; plasticité, comportement

**Résumé :** Chez les mammifères, le système olfactif principal est fonctionnel dans le dernier tiers du stade gestationnel. Le fœtus est donc capable de détecter avec sensibilité, discriminer, et mémoriser les odorants présents dans le liquide amniotique dans lequel il baigne. Chez le rongeur, ces odorants mémorisés *in utero* sont fondamentaux pour la survie du nouveau-né à la naissance en lui permettant de s'orienter vers la mamelle et de déclencher la tétée. Par la suite, ces odorants vont guider le nouveau-né dans ses choix olfactifs et alimentaires et favoriser ses apprentissages ultérieurs. Or, on sait que l'alimentation de la mère fait varier les clés olfactives des fluides biologiques (liquide amniotique, lait) et donc modifie la nature des sources olfactives rencontrées par le fœtus, puis le nouveau-né dans la période périnatale. Dans le but d'évaluer l'impact d'une exposition odorante périnatale sur le fonctionnement et la maturation du système olfactif en relation avec le développement de préférences médiées par l'olfaction et la modulation du stress au moment du sevrage, nous avons mis en place un modèle d'exposition odorante périnatale via l'alimentation maternelle dans une lignée transgénique murine exprimant le récepteur olfactif I7 couplé à une protéine fluorescente, dont l'odorant préférentiel est l'heptanal. Après validation de la présence d'heptanal dans le liquide amniotique et le lait de ces souris par GC-MS-MS, nos résultats montrent que l'exposition périnatale à l'heptanal entraîne une augmentation significative du nombre de glomérules I7 présents au niveau du bulbe olfactif à PN12 par rapport aux animaux contrôles sans modification notable de l'homéostasie tissulaire ou de la transcription du gène I7 au niveau de la muqueuse olfactive. Ce changement structural important au niveau des projections axonales du bulbe olfactif s'accompagne d'un faible effet sur le comportement olfactif des souriceaux dont les capacités de discrimination ne sont que très faiblement améliorées par rapport

aux souriceaux non exposés. A PN21, l'effet de l'exposition odorante sur le nombre de glomérules I7 est atténué, mais reste significatif. A ce stade, les souriceaux odorisés montrent une attraction olfactive pour l'heptanal par rapport au groupe contrôle non exposé, bien que l'effet sur un choix entre aliment odorisé ou pas soit plus contrasté. D'un point de vue moléculaire, ces effets sont associés à une diminution de l'expression du récepteur I7, et de gènes de la signalisation neuronale pouvant traduire une modification de la dynamique cellulaire. Et comme le montrent les résultats obtenus en électro-olfactogramme à cet âge, la sensibilité de la muqueuse olfactive vis-à-vis de l'heptanal est diminuée alors qu'elle ne l'est pas pour d'autres composés odorants. Ces travaux montrent que l'exposition périnatale à un odorant s'accompagne d'effets précoces sur le système olfactif qui impactent son organisation et d'effets sur les choix olfactifs qui se renforcent au cours du développement. Enfin, l'effet d'une exposition périnatale à l'heptanal sur la réponse à des conditions stressantes après séparation maternelle au moment du sevrage a été évaluée en enregistrant des souriceaux CD1 élevés dans les mêmes conditions d'odorisation que les souriceaux *mI7-GFP* adoptés, en open-field odorisé ou non. Nous avons montré que la réaction de stress des souriceaux à PN21, exposés en périnatal à l'heptanal, dans l'open field, est atténuée lorsque l'heptanal est présent dans l'environnement, comparé à la réaction des souriceaux non exposés qui affichent un comportement d'anxiété. Dans l'ensemble, cette étude a donc permis de mettre en évidence les conséquences en terme d'effets comportementaux (préférences médiées par l'olfaction et diminution du stress), structuraux et moléculaires, d'une exposition odorante périnatale chez le jeune, à l'aide d'une lignée transgénique pour laquelle nous disposons de peu de données.

**Title : Effects of chronic perinatal odour exposure on odour sensitivity and olfactory system homeostasis in preweaning mice**

**Keywords :** olfaction ; maternal environment ; olfactory system ; plasticity ; behavior

**Abstract :** In mammals, the main olfactory system displays all the structural and functional characteristics at the last third of the gestational stage. Thus, the fetus is able to detect, to discriminate, but also to memorize the odorants present in the amniotic fluid in which it bathes. In the rodent, these odors memorized *in utero* are fundamental for the survival of the newborn at birth by allowing it to trend itself towards food sources. Afterwards, odorants are guiding the newborn to olfactory and food choices and are promoting subsequent learning. It is known that the mother's diet varies the olfactory keys of the biological fluids (amniotic fluid, milk) and thus modifies the nature of the olfactory sources encountered by the fetus and then the newborn in the perinatal period. The neuroanatomic and functional consequences of this impregnation are the subject of recent studies. The objective of this thesis was to characterize the effects of perinatal odor exposure on the maturation and functioning of the olfactory system in relation to the development of olfactory preferences and to a stressing challenge at weaning. For that, we set up a model of perinatal odor exposure through maternal feeding in the *mI7-GFP* murine transgenic strain expressing the olfactory receptor I7 coupled with the Green Fluorescent Protein (GFP). We evaluated the neuroanatomic, molecular and behavioral consequences on the pups before weaning, and their evolution over time by focusing our efforts on the postnatal stages 3 (PND3), PND12-14 and PND21. Due to the fragility of the transgenic strain, we worked on *mI7-GFP* mice pups cross-fostered by CD1 mice mothers raised under the same conditions after having validated the presence of heptanal in the amniotic

fluid of *mI7-GFP* mice and the milk of CD1 mice by GC-MS-MS. We characterized the effects of perinatal odor exposure on the maturation and functioning of the olfactory system in relation to the olfactory preference until weaning (*mI7-GFP* mice pups under CD1 adoptive mothers) and on the stress reaction to maternal separation at weaning (CD1 mice pups under biological mother). Our results show that perinatal exposure to heptanal leads to a significant increase in the number of I7 glomeruli in the olfactory bulb (OB) associated to a slight modification of the tissue homeostasis in the olfactory mucosa (OM) and to subtle differences in heptanal sensitivity and preferences, that are amplified at PND21. From a molecular point of view, these effects are associated to a down-regulation of the expression of the I7 receptor and genes of neuronal signaling and an odorant-specific decrease in EOG response which may highlight a modification of the cellular dynamics. Finally, the effect of perinatal exposure to heptanal on the response to stressing conditions after maternal separation was assessed by recording CD1 mice pups grown under the same conditions than fostered *mI7* mice on odorized and non odorized open-field. We showed that the reaction of odorized mice in the open field at PND21 is attenuated when the odorant is present in the environment, compared to non odorized mice that display anxiety-like behavior.

Overall, this study demonstrates the consequences of a perinatal odorant exposure in the young, in terms of behavior (olfactory preference and anxiety), structural and molecular plasticity of the olfactory system, on a transgenic strain for which we had little available data.

