



**HAL**  
open science

# Perception olfactive néonatale : exploration des mécanismes périrécepteurs enzymatiques sous-tendant la perception de la phéromone mammaire et influence de l'apprentissage phéromone-induit sur la perception chez le lapereau

Marie-Sabelle Hjeij

## ► To cite this version:

Marie-Sabelle Hjeij. Perception olfactive néonatale : exploration des mécanismes périrécepteurs enzymatiques sous-tendant la perception de la phéromone mammaire et influence de l'apprentissage phéromone-induit sur la perception chez le lapereau. Neurosciences. Université Claude Bernard - Lyon I, 2024. Français. NNT : 2024LYO10222 . tel-04901071

**HAL Id: tel-04901071**

**<https://theses.hal.science/tel-04901071v1>**

Submitted on 20 Jan 2025

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

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



# **THESE de DOCTORAT DE L'UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON 1**

**Ecole Doctorale 476  
Neurosciences et Cognition**

**Discipline : Neurosciences Comportementales**

Soutenue publiquement le 22/11/2024, par :  
**Marie-Sabelle Hjeij**

---

**Perception olfactive néonatale :  
exploration des mécanismes périrécepteurs enzymatiques  
sous-tendant la perception de la phéromone mammaire  
et influence de l'apprentissage phéromone-induit sur la  
perception chez le lapereau**

---

Devant le jury composé de :

Duchamp, Claude	Professeur des Universités/Université Claude Bernard Lyon 1/CNRS	Président
Dussutour, Audrey	Directrice de Recherche/CRCA/CNRS	Rapporteuse
Meunier, Nicolas	Directeur de Recherche/VIM/INRAE	Rapporteur
Loos, Hélène	Professeur du supérieur/Chair of Aroma and Smell Research/FAU	Examinatrice
Coureaud, Gérard	Directeur de Recherche/CRNL/CNRS	Directeur de thèse
Heydel, Jean-Marie	Professeur des Universités/Université de Bourgogne/CSGA	Co-directeur de thèse





---

## Résumé

---

La thèse explore, via une approche volontairement pluridisciplinaire, les mécanismes sous-jacents à la perception olfactive et à l'apprentissage des odeurs chez le lapin nouveau-né. Elle se concentre sur le traitement néonatal de la phéromone mammaire (PM), émise par les lapines allaitantes dans leur lait et détectée par les lapereaux lors du seul allaitement journalier ayant lieu chez cette espèce, en tant que ce signal déclencheur du comportement vital de recherche-prise en bouche de la mamelle chez le nouveau-né. La thèse étudie également une deuxième fonction possédée par la PM, le fait d'agir comme agent renforçateur permettant aux jeunes lapins d'apprendre extrêmement rapidement (1 seul essai) de nouvelles odeurs par association directe avec elle (conditionnement pavlovien).

Les travaux conduits lors de la thèse sont ici présentés en deux études principales, et une étude finale (en cours) visant à illustrer le lien effectif entre les deux premières. L'étude I se consacre à la caractérisation moléculaire et cellulaire de certaines enzymes du métabolisme des xénobiotiques, les glutathion transférases (GSTs), dans le tissu olfactif des lapereaux, ces enzymes étant connues pour être impliquées dans le métabolisme de la PM et dans sa perception. Cette étude indique que les trois classes de GST, Alpha, Mu et Pi métabolisent la PM, que la localisation cellulaire diffère selon la classe de GSTs, et que diffère aussi leur régulation en fonction de l'âge des animaux ou suite à une exposition à la PM. L'étude II évalue l'impact de la concentration et de la volatilité des odorants appris par association avec la PM sur la gamme de perception de ces odorants par les lapereaux post-conditionnement. Elle montre que ces deux paramètres influencent notablement la sensibilité olfactive des nouveau-nés, mais que, quelle que soit la volatilité des odorants, les lapereaux sont aptes à y répondre à des concentrations extraordinairement basses. L'étude III explore l'influence de la compétition enzymatique sur la perception des odeurs apprises, mettant en évidence que cette compétition module la réactivité olfactive des nouveau-nés à ces odeurs.

Les résultats obtenus contribuent à éclairer la compréhension de l'olfaction néonatale chez les mammifères, en mettant en lumière les interactions complexes qui existent entre métabolisme des odorants, perception sensorielle et comportement. Ils nourrissent des questions actuelles en éthologie et neurobiologie, et peuvent présenter des intérêts appliqués dans les secteurs de l'élevage cunicole et de la biotechnologie.

**Mots-clés :** nouveau-né, olfaction, phéromone, odeurs communes, concentrations, muqueuse olfactive, enzymes du métabolisme des xénobiotiques, événements périorécepteurs, compétition enzymatique, seuil de détection, perception, généralisation, apprentissage, comportement.

---

## *Abstract*

---

The thesis explores, through a deliberately multidisciplinary approach, the mechanisms underlying olfactory perception and odour learning in newborn rabbits. It focuses on the neonatal processing of the mammary pheromone (MP), emitted by lactating does in their milk and detected by the pups during the single daily nursing session characteristic of this species. This signal triggers the vital nipple-searching and suckling behavior in the newborn. The thesis also examines a second function of the MP, which acts as a reinforcing agent, allowing young rabbits to learn new odors extremely quickly (in just one trial) through direct association with it (Pavlovian conditioning).

The work presented in the thesis is divided into two main studies, with a final ongoing study aimed at illustrating the connection between the first two. Study I focuses on the molecular and cellular characterization of certain enzymes involved in xenobiotic metabolism, the glutathione transferases (GSTs), in the pups' olfactory tissue. These enzymes are known to be involved in the metabolism and perception of the MP. This study indicates that the three classes of GSTs—alpha, mu, and pi—metabolize the MP, with differing cellular localization for each class, and their regulation varies depending on the age of the animals or following exposure to the MP. Study II assesses the impact of the concentration and volatility of odorants learned through association with the MP on the pups' perception range post-conditioning. It shows that both parameters significantly affect the olfactory sensitivity of the newborns, but regardless of the odorants' volatility, the pups are able to respond to extraordinarily low concentrations. Study III explores the influence of enzymatic competition on the perception of learned odors, revealing that this competition modulates the olfactory reactivity of the newborns to these odors.

The results obtained contribute to a deeper understanding of neonatal olfaction in mammals, highlighting the complex interactions between odorant metabolism, sensory perception, and behavior. These findings raise important questions in ethology and neurobiology and could have practical applications in rabbit farming and biotechnology.

**Keywords:** newborn, olfaction, pheromone, common odors, concentrations, olfactory mucosa, xenobiotic-metabolizing enzymes, perireceptor events, enzymatic competition, detection threshold, perception, generalization, learning, behavior.

---

## *Remerciements*

---

Cette thèse, réalisée au **Centre de Recherche en Neurosciences de Lyon (CRNL)** et au **Centre des Sciences du Goût et de l'Alimentation (CSGA) à Dijon**, n'aurait pas vu le jour sans le soutien et l'aide de nombreuses personnes que je souhaite remercier ici.

Tout d'abord, je tiens à exprimer ma profonde gratitude à mes deux encadrants, **Gérard Coureaud** et **Jean-Marie Heydel**, pour leur soutien, leur guidance et leur confiance tout au long de cette aventure scientifique. Leur expertise et leur passion pour la recherche m'ont permis de grandir en tant que chercheuse, et leur disponibilité a été un réel atout pour mener à bien ce projet. Merci à vous deux pour vos précieux conseils et votre accompagnement tout au long de cette thèse.

Je souhaite exprimer ma profonde gratitude à l'**Agence Nationale de la Recherche (ANR)** pour le financement de ma thèse dans le cadre du projet **ANR NEONATOLF**, dirigé par G. Coureaud et dont J.M. Heydel est l'un des partenaires principaux. Ce soutien financier a été essentiel à la réalisation de mes travaux de recherche, et je remercie chaleureusement l'ANR pour sa contribution.

Je souhaite également remercier **Patricia Duchamp-Viret** et **Fabrice Neiers** pour leur précieuse aide scientifique et leur collaboration. Vos échanges ont grandement enrichi ce travail et je vous suis infiniment reconnaissante.

Mon travail n'aurait pas été possible sans le soutien technique de tous les ingénieurs des deux centres. Je remercie en particulier **Stéphane Fraichard**, **Isabelle Chauvel**, **Franck Menetrier**, et **Nicolas Poirier** pour leur aide inestimable en RT-qPCR, histologie, western blot, et production de protéines recombinantes.

Je tiens à remercier l'**Institut de Chimie de l'Université de Bourgogne** pour leur collaboration dans les études *in vitro* du métabolisme de la phéromone mammaire. Un merci particulier à **Myriam Laly**, **Quentin Bonnin**, et **Gwenaëlle Steyaert** pour leur soutien constant et leur implication.

Je remercie également tous les agents des animaleries de Lyon et de Dijon, dont le travail a été essentiel au bon déroulement de mes expériences. Mes remerciements particuliers vont à **Priscilla Orlando** et **Valérie Saint-Giorgio**, responsables respectives des deux animaleries, pour leur gestion et leur disponibilité, ainsi au CRNL qu'à **Gianni Raponi**, **Elisabeth Vacher** et **Xavier Biolchini** pour leur attention apportée aux animaux et leur aide chaque fois que nécessaire.

Je tiens à exprimer ma gratitude particulière aux membres de mon comité de suivi, **Thierry Thomas-Danguin** et **Jean-François Gherzi-Egea**, pour le temps qu'ils m'ont consacré et pour leurs remarques pertinentes, qui ont grandement contribué à faire progresser ce projet.

Je tiens également à remercier chaleureusement les équipes dans lesquelles j'ai eu la chance de travailler : l'équipe de **Neuro-Ethologie Sensorielle** dirigée par **Nicolas Mathevon**, à Lyon, et l'équipe **3 du CSGA** à Dijon, pour leur accueil et leur aide précieuse.

Mon parcours doctoral n'aurait pas été possible sans l'accompagnement de l'**École Doctorale**, et je souhaite remercier **Anne Didier** et **Jeffrey Maillard** pour leur soutien tout au long de cette période. Un grand merci également à **Virginie Beudoing**, responsable du pôle doctorat à l'Université de Lyon 1, pour son aide précieuse.

Je tiens également à exprimer toute ma gratitude au personnel administratif de Lyon et de Dijon. À Lyon, un merci sincère à **Brigitte Teissier**, **Florence Léger**, et **Anne-Marie Helle** pour leur aide constante. À Dijon, je remercie chaleureusement **Sylvie Millot** et **Laurence Petit** pour leur efficacité et leur disponibilité.

Je souhaite également remercier les directeurs successifs du CRNL qui offrent aux doctorants des conditions de travail de grande qualité : merci donc à **Olivier Bertrand** puis à **Laurent Bézin**, pour leur soutien à la réalisation de cette thèse.

Je n'oublie pas **Sébastien Devillard** et **Georges Alves**, qui m'ont permis de découvrir le plaisir d'enseigner, à l'IUT de Feyssine et à l'Université de Bourgogne respectivement. Leur confiance m'a donné l'opportunité d'acquérir une expérience précieuse dans le domaine de l'enseignement supérieur.

À mes collègues, votre soutien et votre amitié ont rendu cette expérience encore plus enrichissante. Un grand merci à **Valentin, Clémence, Alix, Jade, Lucie, Christine, Mariam, Alena, Xi, Rita** ainsi qu'à tous ceux qui ont partagé cette aventure avec moi.

Un remerciement tout particulier à mon frère, **Maroun**, qui a lui aussi traversé cette aventure académique avant moi et qui m'a été d'un soutien inestimable. Son expérience m'a servi de guide et ses encouragements m'ont permis de surmonter de nombreux défis.

Enfin, un immense merci à ma **famille**, notamment à mes proches au **Liban**, ainsi qu'à tous mes **amis libanais**, pour leur soutien indéfectible et leur encouragement tout au long de ces années..

Cette thèse est le fruit de nombreuses collaborations et je vous en suis profondément reconnaissante.



## *Table de matière*

Résumé.....	3
Abstract.....	4
Remerciements.....	5
Liste des figures .....	12
Liste des tableaux .....	17
Abréviations.....	18
Avant-propos.....	19
Introduction.....	21
A. Olfaction, cognition et comportement néonatal.....	21
1. Chimioréception – Généralités.....	21
2. Communication olfactive mère-jeune .....	23
3. Le cas des odeurs non apprises : les phéromones .....	24
4. Apprentissage olfactif et comportement néonatal.....	26
B. Perception olfactive : qualité et seuils de détections .....	30
1. Les processus de la perception olfactive .....	31
2. Molécule odorante et mélanges d'odorants.....	34
C. Mécanismes sous-tendant la perception olfactive: focus sur le métabolisme des odorants	37
1. Structure et fonction du système olfactif périphérique .....	37
2. Structure et fonction du système olfactif central.....	39
3. Les récepteurs olfactifs et la genèse du message sensoriel périphérique.....	41
4. Les évènements péri-récepteurs .....	43
4.1. Les protéines de liaison des odorants .....	43
4.2. Les enzymes métabolisant les xénobiotiques .....	45
5. Impact des enzymes métabolisant les xénobiotiques sur la perception des odeurs .....	47
D. Notre modèle d'étude: le lapin nouveau-né et la phéromone mammaire.....	50

1. Une phéromone cruciale pour le lapin nouveau-né.....	50
2. Conjugaison de la phéromone mammaire par les glutathions transférases.....	53
2.1. Les glutathion transférases : structure, localisation et fonction.....	54
2.2. L'inhibition des glutathion transférases favorise la détection de la phéromone mammaire .....	57
3. L'apprentissage olfactif phéromone-induit .....	60
3.1. Conditionnement olfactif PM-induit .....	61
3.2. Sensibilité olfactive engendrée par apprentissage PM-induit.....	64
OBJECTIFS .....	67
Etude I.....	69
Caractérisation moléculaire et cellulaire des glutathion transférases impliquées dans le métabolisme de la phéromone mammaire.....	69
1. Introduction .....	69
2. Matériels et méthodes .....	70
2.1. Expériences in vitro .....	70
2.1.1. Production et purification des GSTs.....	70
2.1.2. Préparation pour l'analyse LC-MS.....	71
2.1.3. Métabolisme in vitro de la phéromone mammaire par les GST .....	71
2.2. Expériences in vivo .....	72
2.2.1. Animaux .....	72
2.2.2. Collecte de mucus nasal.....	73
2.2.3. Analyse protéomique du mucus nasal.....	73
2.2.4. Exposition à la phéromone mammaire pendant 45 minutes .....	74
2.2.5. Collecte des tissus.....	74
2.2.6. Immunohistochimie .....	74
2.2.7. Western blot .....	76

2.2.8.	RT-qPCR.....	77
2.2.9.	Comarquage en fluorescence de l'hybridation in situ et de l'immunohistochimie	78
3.	Résultats .....	80
3.1.	Activité de conjugaison d'enzymes recombinantes de GSTs.....	80
3.2.	Expression des GSTs dans le mucus nasal de lapins nouveau-nés et sevrés : Etude protéomique générale .....	82
3.3.	Localisation des GSTs dans le tissu olfactif de lapins nouveau-nés et sevrés .....	87
3.3.1.	Localisation des ARNm.....	88
3.3.2.	Localisation des protéines.....	92
3.4.	Régulation moléculaire des GSTs .....	96
3.4.1.	Régulation des GSTs après exposition à la phéromone mammaire chez des nouveau-nés.....	96
3.4.2.	Régulation des GSTs avec l'âge .....	100
4.	Discussion partielle .....	102
Etude II.....		107
Influence de la concentration d'apprentissage et de la volatilité des odorants sur leur gamme de perception post-conditionnement .....		107
1.	Introduction .....	107
2.	Matériels et Méthodes .....	108
2.1.	Animaux .....	108
2.2.	Odorants.....	109
2.3.	Conditionnement .....	110
2.4.	Tests comportementaux.....	111
2.5.	Analyses statistiques.....	112
3.	Résultats.....	112
3.1.	Réponses des lapereaux à la concentration du SC utilisée durant le conditionnement	112

3.2. Gamme de concentrations réactogènes des odorants après apprentissage .....	114
3.3. Impact de la volatilité des odorants sur leur gamme de perception.....	119
4. Discussion partielle.....	121
Etude III .....	126
Impact du métabolisme des odorants sur leur perception post-conditionnement .....	126
1. Introduction .....	126
2. Matériels et méthodes.....	127
2.1. Animaux .....	127
2.2. Odorants.....	127
2.3. Seuil de perception de l'odorant C .....	127
2.4. Compétition enzymatique C+D.....	128
2.5. Contrôles.....	128
2.6. Analyse statistique.....	128
3. Résultats .....	129
3.1. Seuil de détection-perception de l'odorant C .....	129
3.2. Seuil de détection-perception de l'odorant C en présence de l'odorant D .....	130
3.3. Seuil de détection-perception de l'odorant C en présence de l'odorant E.....	132
4. Discussion partielle .....	133
Discussion finale, conclusion et perspectives.....	135
Bibliographie.....	143
Annexes.....	175

## Liste des figures

Figure 1: Catégories de signaux olfactifs auxquels les lapereaux peuvent répondre comportementalement à la naissance suite à leur perception sur le corps maternel (dessin original de M.S. Hjeij effectué avec Biorender). .....	29
Figure 2: Schéma illustrant la perception des odeurs chez les mammifères, allant de la périphérie au système cérébral central et au comportement (dessin original de M.S. Hjeij effectué avec Biorender). .....	31
Figure 3: Figure simplifiée de la perception théorique de mélanges binaires constitués d'une molécule A et d'une molécule B. La lettre U étant une odeur nouvelle perçue différemment de l'odeur de A et B (figure tirée de Thomas-Danguin et al., 2014). .....	36
Figure 4: Structure de l'épithélium olfactif et du bulbe olfactif (figure adaptée de O'Brien et al., 2012). .....	39
Figure 5: Schéma des principales structures du système olfactif depuis la périphérie nasale jusqu'au cortex olfactif secondaire (figure adaptée de Roi, 2013). .....	41
Figure 6: Le récepteur olfactif, un récepteur couplé à la protéine G (dessin adapté de Urbani et al., 2022 et réalisé avec Biorender). .....	43
Figure 7: Illustration des 3 phases du métabolisme des xénobiotiques (dessin adapté de Heydel et al., 2013 et réalisé avec Biorender). .....	46
Figure 8: Formule chimique du 2-méthyl-2-buténal, la phéromone mammaire (PM) (A). Comportement de recherche et de saisie orale des lapins nouveau-nés face à une baguette en verre imprégnée de PM (B). Gain de poids (g) à J1 et mortalité (%) sur la période J1-7 de lapereaux non répondants (Non R) ou répondants (R) à la PM à J1 (C). Proportions de lapereaux répondant à la PM, à jeun, en conditions d'élevage et en conditions naturelles entre la naissance (J0) et le sevrage (J21 en nature, J28 en élevage) (D). (Figures tirées de Coureaud et al., 2008 et 2010). .....	53
Figure 9: Structure du monomère (A) et du dimère (B) de la GSTA1 de lapin (Q08863). Obtenue depuis Uniprot ( <a href="https://www.uniprot.org/uniprotkb/Q08863/entry">https://www.uniprot.org/uniprotkb/Q08863/entry</a> ) .....	56
Figure 10: Formation du conjugué phéromone mammaire-glutathion suite à l'action des glutathion transférases. ....	58
Figure 11: Compétition avec le 2M2P ou le 3M2B de la conjugaison de la PM au glutathion par les GSTs, conduisant à une augmentation des molécules de PM disponibles dans l'environnement	

péri-récepteur (A), et impliquant une meilleure détection à des concentrations très faible de la PM ( $10^{-9}$ g/ml), habituellement non réactogène (B) (Hanser et al., 2017). .....	60
Figure 12: Procédure d'apprentissage d'une odeur nouvelle par association à la PM (phase de conditionnement suivie d'une phase de test 24h après) (dessin original de M.S. Hjeij réalisé avec Biorender). .....	62
Figure 13: Proportions de lapereaux répondant par le comportement de recherche (barres blanches) et de saisie orale de la baguette en verre (barres grise) à l'odorant E (acétoacétate d'éthyle) et F (furanéol) lorsqu'ils ont été appris par association avec la PM à la concentration $10^{-6}$ et $10^{-5}$ g/ml ainsi que leur réponse à la PM à ces deux concentrations (A), à l'odorant E et F lorsqu'ils ont été PM-appris ou après application sur l'abdomen de la lapine (B) et à l'odorant E selon le temps (en heure) auquel le test a été effectué après l'association (n de lapins testés) (C)(Coureaud et al., 2006). .....	63
Figure 14: Proportions de lapins nouveau-nés répondant à l'odorant B à $10^5$ g/ml, en fonction de la concentration de B utilisée lors du conditionnement (détermination du seuil de détection spontané) (A). Proportions de lapins nouveau-nés répondant à l'odorant B à des concentrations variées après le conditionnement à B $10^{-5}$ g/ml (détermination du seuil de détection post-conditionnement) (B) (Figure tirée de Duchamp-Viret et al., 2021). .....	66
Figure 15: Chromatogramme CAD montrant le conjugué PM-glutathion après des essais enzymatiques avec la protéine recombinante GST (A). Confirmation de l'identification du conjugué (392,1 m / z) à l'aide d'un détecteur de spectrométrie de masse dans le même cycle chromatographique (B). .....	81
Figure 16: Pourcentage de protéines trouvées dans le mucus nasal de lapins juvéniles (nouveau-nés et sevrés, sans dissociation) selon leur fonction. ....	83
Figure 17: Nature et nombre de protéines retrouvées dans le mucus nasal de lapins nouveau-nés (NN) et sevrés (SV), ainsi que nombre de protéines communes aux deux catégories d'âge en fonction de leur groupe fonctionnel. ....	85
Figure 18: Hybridation in situ de GSTA1 (A) et GSTP1(B) dans la MO de lapins nouveau-nés. Mosaïque d'images au grossissement x4 (1 mm) incluant une image au grossissement x20 (100µm). C1-C4 : cornets olfactifs 1 à 4 ; EO : épithélium olfactif ; CS : cellules sustentaculaires ; GB : glandes de Bowman ; NSO : neurones sensoriels olfactifs. ....	89

Figure 19: Hybridation in situ de GSTA1 (A) et GSTP1(B) dans la muqueuse olfactive de lapins sevrés (x20 ; 100µm). EO : épithélium olfactif ; CS : cellules sustentaculaires ; GB : glandes de Bowman ; NSO : neurones sensoriels olfactifs.....	90
Figure 20: Co-marquage des ARNm de la GSTA1 (en vert) avec la protéine ribosomique S6 phosphorylé (en rouge) (A) et avec le Dapi (en bleu) (B) dans l'épithélium olfactif de lapins nouveau-nés (images x20 ; 100 µm). PS6 : protéine ribosomique S6 phosphorylé ; EO : épithélium olfactif ; CS : cellules sustentaculaires ; GB : glandes de Bowman ; NSO : neurones sensoriels olfactifs. ....	91
Figure 21: Co-marquage des ARNm de la GSTP1 (en vert) avec la protéine ribosomique S6 phosphorylé (en rouge) (A) et avec le Dapi (en bleu) (B) dans l'épithélium olfactif de lapins nouveau-nés (images x20 ; 100 µm). PS6 : protéine ribosomique S6 phosphorylé ; EO : épithélium olfactif ; CS : cellules sustentaculaires ; GB : glandes de Bowman ; NSO : neurones sensoriels olfactifs. ....	91
Figure 22: Western blot de GSTA (A) et GSTP1 (B) sur la muqueuse olfactive de 5 lapins nouveau-nés (lignes 1 à 5) et avec les protéines recombinées de GSTA1 et GSTP1 (lignes 7). Les lignes 6 représentent le marqueur de poids moléculaire de la protéine.....	93
Figure 23: Immunohistochimie en visible de GSTA dans la cavité nasale de lapins nouveau-nés (A) et sevrés (B). Mosaïque d'images au grossissement x4 (500 µm) incluant une image au grossissement x40 de l'épithélium olfactif (50 µm) dans le coin inférieur gauche. EO : épithélium olfactif, CS : cellules sustentaculaires, NSO : neurones sensoriels olfactifs, CB : cellules basales, GB : glandes de Bowman. ....	94
Figure 24: Immunohistochimie en visible de GSTP1 dans la cavité nasale de lapins nouveau-nés (A) et sevrés (B). Mosaïque d'images au grossissement x4 (500 µm) incluant une image au grossissement x40 de l'épithélium olfactif (50 µm) dans le coin inférieur gauche. EO : épithélium olfactif, CS : cellules sustentaculaires, NSO : neurones sensoriels olfactifs, CB : cellules basales, GB : glandes de Bowman. ....	95
Figure 25: Immunohistochimie en fluorescence (x40 ; 50 µm) de GSTP1 (rouge), des noyaux (bleu) et de leur colocalisation (violet) dans l'épithélium olfactif de lapins nouveau-né.. EO : épithélium olfactif, CS: cellules sustentaculaires, GB : glandes de Bowman. ....	96
Figure 26: Expression des ARNm des GSTs dans la muqueuse olfactive de lapins nouveau-nés après exposition à la PM pendant 45 min à la concentration $10^{-5}$ (PM <sup>-5</sup> ) et $10^{-2}$ (PM <sup>-2</sup> ) g/ml par	

rapport à des lapereaux exposés à de l'eau (contrôles) (n=5/condition). Comparaison avec la formule DDCT. *** : p < 0.001, ** : p < 0.01 .....	98
Figure 27: Western blot de GSTA (gels inférieurs) et de Tubuline (gels supérieurs) dans la muqueuse olfactive de lapins nouveau-nés contrôles (n=5) exposés à l'eau (lignes 1 à 5) et de nouveau-nés exposés à la PM (lignes 7 à 11) à 10 <sup>-5</sup> (A) ou 10 <sup>-2</sup> (B) g/ml pendant 45 min (n=5/groupe). Les marqueurs de poids moléculaire des protéines sont indiqués dans la ligne du milieu (ligne 6).....	99
Figure 28: Western blot de GSTP1 et de Tubuline sur les mêmes gels dans la muqueuse olfactive de 5 lapins nouveau-nés contrôles exposés à l'eau (lignes 2-6 gels supérieurs et lignes 1-5 gels inférieurs) et 5 exposés à la PM à 10 <sup>-5</sup> (A) ou 10 <sup>-2</sup> (B) g/ml (lignes 7-11) pendant 45 min. Les marqueurs de poids moléculaire des protéines sont indiqués ligne 1 pour A et ligne 6 pour B. ..	99
Figure 29: Expression des ARNm des GSTs dans la muqueuse olfactive de lapins sevrés (SV) par rapport à des nouveau-nés (NN) (n=5/condition). Comparaison avec la formule DDCT. ....	101
Figure 30: Western blot de GSTA (gel inférieur) et de Tubuline (gel supérieur) dans la muqueuse olfactive de 5 lapins nouveau-nés (NN, lignes 1 à 5) et 5 lapins sevrés (SV, lignes 7 à 11). Le marqueur de poids moléculaire des protéines est indiqué dans la ligne du milieu (ligne 6). .....	101
Figure 31: Western blot de GSTP1 et de Tubuline sur les mêmes gels dans la muqueuse olfactive de 5 lapins (NN, lignes 2 à 6) et 5 lapins sevrés (SV, lignes 7 à 11). Le marqueur de poids moléculaire des protéines est indiqué dans la première ligne (ligne 1). .....	102
Figure 32: Proportions de lapins nouveau-nés répondant par le comportement typique de recherche-saisie orale au stimulus conditionné présenté à la concentration utilisée lors du conditionnement (odorant A: barres noires, odorant B: barres grises). Chaque barre correspond à un groupe différent, conditionné à la concentration de SC mentionnée en abscisse (n = 20 lapereaux par groupe). .....	113
<i>Figure 33: Proportions de lapereaux répondant (en ordonnées) en fonction de la concentration testée de l'odorant A conditionné (en abscisse), pour chacune des concentrations de A associées à la PM (SC A-5 à -22 g/ml). Au sein de chaque histogramme la barre la plus claire signale la proportion de répondants à la concentration apprise du SC. L'astérisque signale une différence significative d'avec le reste des concentrations testées (p ≤ 0,05). .....</i>	116
Figure 34: Proportions de lapereaux répondant (en ordonnées) en fonction de la concentration testée du stimulus conditionné, ici l'odorant B (en abscisse), pour chacune des concentrations de	



B associées avec la PM. Au sein de chaque histogramme, la barre la plus claire signale la proportion de répondants à la concentration apprise du SC. L'astérisque signale une différence significative avec le reste des concentrations testées ( $p \leq 0,05$ ).....	118
Figure 35: Seuil de perception spontanée (flèches blanches), limite qualitative perceptuelle (flèches grises) et seuil de détection-perception absolue (flèches noires) post-conditionnement observés pour l'odorant A (en haut) ou l'odorant B (au milieu). .....	121
Figure 36: Proportions de lapereaux répondant (en ordonnées) à différentes concentrations d'odorant C (en abscisse) après apprentissage de celui-ci par association avec la PM. La barre la plus claire signale la proportion de répondants à la concentration apprise de C ( $10^{-5}$ g/ml). L'astérisque indique une différence significative entre les concentrations en question et les autres concentrations testées ( $p \leq 0,05$ ).....	129
Figure 37: Proportions de lapereaux répondant (en ordonnées), après conditionnement à l'odorant C à la concentration $10^{-5}$ g/ml, à une concentration inférieure de C inférieure à son seuil de détection-perception ( $C^{-17}$ g/ml) lorsque C est présenté en mélange avec l'odorant D à diverses concentrations ( $D^{-5}$ , $D^{-10}$ , $D^{-15}$ et $D^{-17}$ g/ml) (en abscisse). .....	130
Figure 38: Proportions de lapereaux répondant (en ordonnées), après conditionnement à l'odorant C $10^{-5}$ g/ml, à la concentration du seuil de détection-perception de C ( $C^{-16}$ g/ml) ou une concentration juste inférieure au seuil ( $C^{-17}$ g/ml), ainsi qu'aux mélanges $C^{-16}+D^{-5}$ , $C^{-17}+D^{-5}$ , $C^{-17}+E^{-5}$ et $C^{-17}+E^{-6}$ (en abscisse). Les lettres a et b indiquent une différence significative ( $p \leq 0,001$ ). .....	131
Figure 39: Proportions de lapereaux naïfs non conditionnés répondant (en ordonnées) à l'odorant D à la concentration $10^{-5}$ g/ml, au mélange $C^{-17}+D^{-5}$ , à l'odorant E aux concentrations $10^{-5}$ et $10^{-6}$ g/ml, ainsi qu'à la PM à la concentration $10^{-5}$ g/ml. Les astérisques indiquent une différence significative ( $p \leq 0,001$ ).....	132

## Liste des tableaux

Tableau 1: Amorces utilisées pour l'analyse RT-qPCR ainsi que leur efficacité.....	78
Tableau 2: Métabolisme in vitro de trois classes de GSTs envers la PM et le cinnamaldéhyde, exprimé par la moyenne de l'aire du pic du conjugué formé ( $\pm$ écart-type).....	82
Tableau 3: Nombre moyen de peptides des EMXs retrouvés dans le mucus nasal de lapins nouveau-nés (NN) versus de lapins sevrés (SV).....	86
Tableau 4: Moyenne des Ct ( $\pm$ écart-type) des GST dans la muqueuse olfactive de lapins nouveau-nés exposés à l'eau (contrôle) et à la PM à la concentration $10^{-5}$ (PM <sup>-5</sup> ) et $10^{-2}$ (PM <sup>-2</sup> ) g/ml pendant 45 min (n=5). L'actine et la GAPDH sont utilisées comme gènes de référence.....	97
Tableau 5: Moyenne des Ct ( $\pm$ écart-type) des GSTs dans la muqueuse de lapins nouveau-nés (NN) et sevrés (SV) (n = 5/groupe). L'actine et la GAPDH étaient utilisées comme gènes de référence.....	100
Tableau 6: Estimation des correspondances entre concentrations en g/ml (phase liquide) et mol/l (phase gazeuse) pour les odorants A et B. Les valeurs de la constante de Henry utilisées pour A et B étaient respectivement de $1,18 \times 10^2$ et $1,12 \times 10^{-4}$ pa/m <sup>3</sup> /mol (cf. Matériel et Méthodes)...	120

---

## *Abréviations*

---

2FT : 2-furfurylthiole	ppt : parties par billion
2M2B : 2-méthyl-2-buténal	PTR-MS : spectrométrie de masse à réaction de transfert de protons
2M2P : 2-méthyl-2-penténal	ROs : récepteur olfactif
3M2B : 3-méthyl-2-buténal	RT-qPCR: réaction en chaîne par polymérase quantitative en temps réel après transcription inverse
AKR : aldo-céto-réductase	SC : stimulus conditionné
ALDH : aldéhyde déshydrogénase	SI : stimulus inconditionnel
AOX : aldéhyde oxydase	TMT : triméthylthiazoline
CB : cellule basale	UGT : UDP-glucuronosyltransférases
CES : carboxyle esterase	CSP : protéines liant signaux chimiosensoriel
CS : cellule sustentaculaire	CYP450 : cytochrome P450
GST : glutathion transférases	DMDS : disulfure de diméthyle
HIS : hybridation <i>in situ</i>	EMX : enzymes métabolisant les xénobiotiques
IHC : immunohistochimie	EO : épithélium olfactif
MO : muqueuse olfactive	EOG : électoolfactogramme
MN : mucus nasal	FMS : sulfure de furfurylméthyle
NSO : neurone sensoriel olfactif	GB : glande de Bowman
OBP : protéine de liaison des odorants	GC-MS : chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse
PBP : protéines liant des phéromones	
PM : phéromone mammaire	
ppb : parties par milliard	
ppm : parties par million	
ppq : parties par quadrillion	

---

## *Avant-propos*

---

Face à un environnement riche en stimuli, les systèmes sensoriels et le cerveau doivent prioriser et détecter rapidement les informations les plus pertinentes pour la survie de l'individu. L'olfaction, cruciale à la perception de certains stimuli chimiques est, contrairement à la vision et l'audition, fonctionnelle dès la naissance, et même dès avant la naissance (avec le sens tactile) chez tous les mammifères ; elle est notamment utilisée pour l'interaction avec la mère, la recherche de nourriture et l'esquive de dangers potentiels (Q. Li & Liberles, 2015). Pour ceci, le système olfactif doit être suffisamment efficace pour rendre la perception d'odeurs instantanée et précise. Cela peut se faire soit du fait de processus canalisés permettant le traitement prédisposé de certains signaux spontanément pertinents (phéromones), soit du fait de processus plastiques permettant le traitement de signaux appris (Teicher & Blass, 1977; Pedersen & Blass, 1982; Hepper, 1991; Schaal et al., 1995; Coureaud et al., 2002). Le traitement de ces informations débute dès la périphérie du système olfactif, i.e. le nez et les narines chez les mammifères, dans le cas du système olfactif principal. Depuis une vingtaine d'années (Krishna et al., 1994; Ling et al., 2004a; Heydel et al., 2013), il est connu que certaines enzymes métabolisant les xénobiotiques (EMXs) sont présentes au sein du système périphérique. Leur rôle exact reste à caractériser pleinement, mais plusieurs travaux suggèrent aujourd'hui qu'elles pourraient être un des facteurs essentiels à la perception des odeurs soit en bio-transformant les molécules odorantes initiales entrant dans les narines en molécules inactives pour mettre fin au signal, soit en synthétisant des métabolites, identiques ou différents des odorant initiaux, pour poursuivre le signal (Heydel et al., 2013). Ma thèse s'est intéressée à la caractérisation biochimique d'une famille spécifique de ces enzymes, les glutathions transférases (GST), et à l'identification de leur rôle dans la perception olfactive chez un modèle d'étude pertinent, le lapin nouveau-né (Etude I).

Chez le lapereau, la phéromone mammaire (PM) est une substance chimique monomoléculaire (2-méthyl-2-buténal, 2M2B) contenue dans le lait de lapines qui déclenche le comportement typique de recherche des mamelles caractérisé par des mouvements céphaliques très rapides et de faible amplitude, ainsi que des mouvements de saisie buccale ; ce comportement aboutit à la prise lactée (Coureaud, 2000; Schaal et al., 2003). La réponse à la PM est corrélée à la survie des jeunes lapins, dans la fenêtre développementale de vie où l'alimentation lactée est

exclusive (15 premiers jours postnatals; (Coureaud et al., 2007). L'étude de la perception de la PM chez les lapereaux est d'intérêt non seulement pour son rôle dans la prise lactée, mais car ce même signal biologique joue sur la plasticité cognitive néonatale en présentant un pouvoir positif renforçant: lorsque de nouveaux odorants ou mélanges d'odorants, initialement inactifs sur le comportement, sont perçus en présence de PM, ils sont appris extrêmement rapidement et deviennent à leur tour des déclencheurs efficaces du comportement de recherche des mamelles (e.g., Coureaud et al., 2006, 2014, 2022). Ma thèse s'est aussi penchée sur cette plasticité cognitive en évaluant en quoi les conditions de concentration d'un stimulus nouveau, appris par association avec la PM, influe sur le seuil de perception et la gamme de concentrations actives de ce stimulus post-conditionnement (Etude II), et quelle influence les EMXs peuvent-elles avoir sur la perception d'un odorant appris (étude III).

Cette thèse a pris place dans le projet de recherche ANR NEONATOLF (2021-25), multidisciplinaire, porté par G. Coureaud et regroupant plusieurs partenaires dont le CSGA via notamment J.M. Heydel. Jean-Marie et Gérard collaborent depuis 2007 sur le rôle des EMXs dans la perception olfactive du lapereau. Ce projet ANR vise à cerner davantage le fonctionnement et la plasticité du système olfactif chez ce modèle mammalien à la naissance, au travers d'approches mêlant protéomique, biochimie, biologie moléculaire, pharmacologie, neurobiologie et éthologie, tout en amenant à réflexion sur nouvelles applications potentielles en élevage (réduction de la mortalité des jeunes, aide à la transition alimentation lactée/solide).

Les 3 premières parties (A, B et C) de l'état de l'art présenté ci-après sont conçues pour expliquer certains aspects de l'olfaction, l'organisation du système olfactif, la perception olfactive, et l'implication d'acteurs entrant en jeu dans le processus olfactif tels que les EMXs. Ils faciliteront la compréhension de la partie D qui décrit le modèle du lapin nouveau-né, la PM, et fait état d'études récentes permettant de présenter nos objectifs et les études conduites. Comme énoncé ci-dessus, celles-ci ont été, par souci de clarté, scindées en deux grandes études, I et II, accompagnées d'une étude III plus préliminaire, présentée à ce stade comme une sorte de « preuve de concept » visant à tester le lien entre les études I et II. Chacune de ses études inclue une section introduction, matériels et méthodes, résultats, et discussion partielle/conclusion. En fin de manuscrit, une discussion générale et une conclusion finale reprennent certains des principaux résultats de la thèse et ouvrent sur de possibles perspectives.

---

## *Introduction*

---

### **A. Olfaction, cognition et comportement néonatal**

Dans cette partie, l'importance de l'olfaction dans la vie quotidienne des animaux, Homme inclus, est évoquée, en se concentrant sur des illustrations de son rôle critique dans la communication et l'interaction mère-jeunes. L'existence de stimuli, appris ou non-appris, participant à l'orientation du nouveau-né vers la mère et à la localisation des tétines est exposée.

#### **1. Chimioréception – Généralités**

Phylogénétiquement, la chimioréception est le plus ancien processus sensoriel permettant aux organismes, y compris ceux microscopiques, de détecter les signaux chimiques et d'interagir avec leur environnement (Hoskison, 2013; Bochicchio & Winsler, 2020). Par exemple, un type de chimioréception cellule-cellule connu sous le nom de "quorum sensing" se produit chez les bactéries lorsqu'elles atteignent des densités de population élevées afin de réguler et de coordonner leur croissance (Bassler, 2002). Chez les plantes, ce type de communication est médié par la production de molécules chimiques au niveau de racines ou des parties aériennes, ce qui permet de réguler leur croissance et de contribuer à l'attraction/répulsion de pollinisateurs et de parasites (Dobson & Crawley, 1994; Fukano, 2017).

Chez les animaux terrestres et aquatiques (disposant d'un système olfactif), l'odorat et le goût sont les sens permettant la chimioréception. L'olfaction chez les animaux aquatiques a longtemps été controversée voire niée, sur la base de l'idée que le système olfactif ne pourrait être stimulé qu'à travers un espace gazeux (Hara, 1975). En fait, les animaux vivant immergés possèdent souvent un système olfactif anatomiquement développé permettant par exemple aux petits comme aux grands poissons de discriminer des odeurs et de moduler leur comportement en fonction (Hara, 1975). Un exemple de l'efficacité de la perception olfactive aquatique a été décrit dans le livre "Olfactory Imprinting and Homing in Salmon" (Hasler et Scholz, 1983) où les auteurs pointent la capacité des saumons de détecter des stimuli olfactifs spécifiques dans l'eau, leur permettant de naviguer de l'océan vers les cours d'eau douce où ils sont nés. Ces stimuli incluent des composés chimiques présents dans l'eau de leur rivière d'origine, qui agissent comme des "signatures" olfactives. L'olfaction est également très largement étudiée et décrite chez les

insectes, les amphibiens et les mammifères, chez qui elle contribue par exemple à identifier et appréhender de la nourriture comestible, à interagir avec des partenaires sociaux et sexuels, et à esquiver des dangers potentiels. En termes de danger potentiel, on peut notamment citer le cas de la réponse comportementale au triméthyl thiazoline (TMT), molécule trouvée dans les fèces de renards, induisant peur et stress chez le rat (immobilité, évitement, réduction d'appétence et de prise alimentaire), une proie du renard (Endres et al., 2005).

Bien que l'olfaction paraisse souvent secondaire par rapport à la vue chez l'Homme, son intérêt est primordial de la naissance, voire même de la vie prénatale, à l'âge adulte (Bochicchio & Winsler, 2020). Chez le nouveau-né, l'odorat est essentiel pour réagir à l'odeur de la mère et du lait maternel, et contribuer ainsi à la tétée et l'installation d'un lien d'attachement envers la mère/les parents/la fratrie. De plus, certaines odeurs, comme celle de la vanilline (vanille), ont des effets spontanément appétant voire apaisant chez l'enfant, et ont par exemple été utilisées pour réduire la fréquence de l'apnée chez des bébés souffrant de problèmes respiratoires (Edraki et al., 2013; Kanbur & Balci, 2020; Duchamp-Viret et al., 2021). À mesure que l'enfant grandit, l'olfaction contribue à la découverte de l'environnement et au développement des préférences alimentaires. L'odeur des aliments familiers, par exemple, peut évoquer des souvenirs d'enfance et influencer les choix alimentaires à l'âge adulte (Herz, 2016). Chez l'adulte, également, l'olfaction est impliquée dans la perception des saveurs et l'identification des substances potentiellement dangereuses, telles que les aliments avariés ou toxiques (Hoskison, 2013). Les odeurs corporelles jouent, de leur côté, un rôle probable dans l'attraction sexuelle et le choix des partenaires, influençant ainsi les interactions sociales et les relations intimes (Havlicek & Roberts, 2009). Avec l'âge, des troubles olfactifs peuvent apparaître, affectant la qualité de vie d'autant qu'ils sont parfois liés à des troubles psychologiques comme l'anxiété et la dépression (Brand & Schaal, 2017). Dans ce cas, des thérapies olfactives, utilisant des odeurs apaisantes comme la lavande, sont parfois employées pour générer des pensées positives et réduire le stress (Herz, 2016). Chez les personnes âgées, la diminution de l'odorat peut affecter la nutrition et la sécurité alimentaire, soulignant l'importance de conserver autant que possible une olfaction opérationnelle tout au long de la vie. Ces études sur les troubles olfactifs chez l'Homme ont trouvé d'autant plus d'écho et d'attention ces dernières années du fait de la pandémie de COVID entamée fin 2019. La chimioréception joue ainsi un rôle significatif chez les organismes vivants au sens large, des plus petits microorganismes jusqu'aux végétaux et animaux, y compris l'Homme.

## 2. *Communication olfactive mère-jeune*

La formation d'un lien mère-jeune est très importante pour la survie du nouveau-né. Le processus de reconnaissance mutuelle entre la mère et son/ses nouveau-nés repose sur l'utilisation des signaux sensoriels et le développement de mécanismes neurobiologiques, cognitifs et comportementaux sous-jacents (Lévy et al., 2004). Parmi les sens impliqués, l'olfaction joue un rôle critique notamment dans la reconnaissance de la mère par le jeune, et dans la capacité du jeune à interagir avec sa mère pour localiser la.té.tine.s et téter. Cette prépondérance de l'olfaction dans le comportement du nouveau-né s'observe chez tous les mammifères, qu'il s'agisse d'espèces nidicoles comme d'espèces nidifuges (Mota-Rojas et al., 2022). Si son implication s'observe dès la naissance, l'olfaction est en fait fonctionnelle dès la vie fœtale, en étant le deuxième sens à devenir opérationnel chez le fœtus après la somesthésie (Müller & O'Rahilly, 1989).

De multiples études ont été menées sur les odeurs maternelles et leurs effets sur le comportement du nouveau-né à compter de la fin des années 70s et du début des années 80s (du siècle dernier). Le bébé humain réagit ainsi à l'odeur du lait maternel et s'oriente efficacement vers les seins de sa mère lorsqu'ils sont non lavés; odeurs qui contribuent à sa localisation et prise en bouche des mamelons pour téter (Varendi et al., 1994; Porter & Winberg, 1999). Le bébé reconnaît par ailleurs l'odeur de sa mère et produit sélectivement des mouvements de bouche lorsque lui sont présentés des vêtements portés par sa mère la veille comparativement à une mère non familière (Sullivan & Toubas, 1998; Marin et al., 2015; Hym et al., 2021). Ce type de comportements s'observe chez les mammifères au sens large. Chez les agneaux, ces comportements sont déclenchés par l'odeur du liquide amniotique, du suint et du lait maternel, facilitant la localisation du trayon peu après la naissance (Nowak et al., 1997). Chez les chatons, l'olfaction contribue à la localisation des télines et voit les chatons mieux répondre aux indices olfactifs maternels qu'à ceux d'autres femelles, suggérant une influence d'odeurs apprises, en plus ou en parallèle d'odeurs ne l'étant pas (review dans Mermet et al., 2007). Chez le lapin, nous y reviendrons un peu plus tard, les odeurs jouent également un rôle déterminant dans le guidage des lapereaux vers les télines maternelles (Hudson & Distel, 1982; Distel & Hudson, 1985; Raihani et al., 2009). Dès la naissance, puis lors de chaque visite de la mère au nid, le lapereau entre en contact avec l'abdomen de la lapine et parvient à localiser une tétine en moins de 15 secondes grâce à son odorat (Hudson & Distel, 1982; Coureaud et al., 2004). Les odeurs maternelles ne font pas que faciliter l'allaitement, mais peuvent aussi apaiser le nourrisson lorsqu'il pleure (Sullivan &



Toubas, 1998), réduire les cris face à la douleur (Nishitani et al., 2009), et la réponse neurale face à des expressions faciales craintives (Jessen, 2020). Chez les porcelets, des signaux olfactifs émis par la truie, aident le porcelet à trouver les télines puis, au moment du sevrage, réduisent leur agressivité (Fraser, 1978).

La mère est de son côté notablement attirée par l'odeur de son.ses nouveau-né.s et pourrait la reconnaître après seulement une exposition (Porter et al., 1983; Okamoto et al., 2016). Selon certaines études, les parents qui reconnaissent l'odeur de leurs enfants ont tendance à avoir une relation plus affective et attentionnée avec eux (Dubas et al., 2009; Croy et al., 2019). Chez les rongeurs, le comportement maternel est particulièrement influencé par les odeurs émanant de la progéniture. Le propionate de dodécyle, un composé libéré par les glandes préputiales des rats, induit le comportement de léchage anogénital, un comportement fondamental chez les rates permettant un renforcement du lien et la reconnaissance mutuelle mère-bébé (Lévy et al., 2004). Par ailleurs, la bulbectomie olfactive élimine les comportements maternels chez des souris (Sato et al., 2010).

Les signaux olfactifs interviennent donc très significativement dans le développement précoce et l'attachement entre la mère et l'enfant. Les interactions olfactives peuvent prendre la forme de molécules odorantes non apprises à haute valeur biologique telles que les phéromones, ou se manifester sous forme de stimuli appris dans l'environnement pré- et périnatal. Ces deux formes de stimuli sont évoquées ci-dessous.

### 3. *Le cas des odeurs non apprises : les phéromones*

La définition initiale du concept de phéromone a été proposée par Karlson et Lüscher en 1959. Elle désignait alors une substance chimique libérée par un organisme émetteur qui provoque une réponse physiologique/comportementale donnée chez un individu receveur appartenant à la même espèce que l'émetteur. Ce concept a notamment été créé pour qualifier la première phéromone identifiée et décrite que fut le bombykol, molécule chimique produite par les femelles de ver à soie (*Bombyx mori*) déclenchant l'attraction des mâles de l'espèce lorsque les femelles sont prêtes à se reproduire. Les mâles détectent et réagissent à la présence de cette phéromone dans l'air à de très faibles concentrations (environ 170 molécules/millilitres) et, si nécessaire à plus de 10 kms, grâce à leurs antennes et sensilles olfactives abritant les neurones récepteurs olfactifs. Ces

derniers, responsables de cette sensibilité remarquablement élevée, sont même capable de détecter et de ne répondre qu'à une seule molécule (Tabuchi et al., 2013; Kaissling, 2014a).

La définition originelle du concept de phéromones a été longtemps débattue chez les mammifères, et revue par Beauchamp et collaborateurs en 1976. Selon ces auteurs, un signal doit satisfaire 5 critères strictes pour pouvoir être qualifié de phéromonal: 1- signal monomoléculaire ou bouquet simple de molécules (assurant ainsi une volatilité fort au signal), 2- signal induisant une réponse comportementale stéréotypée intra- et inter-individus ainsi qu'une réponse fonctionnelle, utile à l'individu receveur, 3- signal dont l'activité est sélective et 4 - exclusive à l'espèce, tout en étant 5- actif indépendamment de tout apprentissage préalable.

Depuis, plusieurs signaux désignés ou suspectés comme étant phéromonaux ont été décrits dans le règne animal (sans pour autant avoir été testés aux 5 critères ni, même, dans certains cas, sans y répondre nécessairement), avec comme rôles principaux l'attraction d'un partenaire sexuel, le marquage du territoire, le signalement de dangers, ou la coordination de comportements sociaux (Wyatt, 2017). Chez les insectes volants, la détection de phéromones peut se faire au travers de « plumes odorantes ». Ce terme provient du fait que les phéromones émises par ces insectes diffusent dans l'air sous la forme de plumes de molécules, étroites à la source et s'élargissant au fur et à mesure que les molécules se dispersent dans l'air. Les insectes sociaux vivant en colonies, tels que les abeilles et les fourmis, sont capables de reconnaître les membres du groupe, d'interagir ensemble et de prendre des décisions grâce aux phéromones libérées (Greene & Gordon, 2003; Vernier et al., 2019). Par exemple, les fourmis *Pheidole megacephala* utilisent deux types de phéromones pendant le fourragement : une phéromone d'exploration, qui dure longtemps et est déposée lors de l'exploration, et une phéromone de fourragement, qui dure peu de temps et est déposée après avoir trouvé de la nourriture. La combinaison de ces deux phéromones est plus efficace que l'utilisation d'un seul type, car elle permet aux fourmis de mémoriser durablement leur environnement grâce à la phéromone d'exploration, tout en restant flexibles pour réagir rapidement aux nouvelles sources de nourriture grâce à la phéromone de fourragement (Dussutour et al., 2009). Chez les mammifères, les souris mâles utilisent notamment deux signaux souvent qualifiés de phéromones sexuelles, l'une secrétée dans les sécrétions oculaires appelée peptide 1, et l'autre secrétée dans l'urine qualifiée de protéine urinaire majeure (MUP) ; ces signaux permettent l'attraction de souris femelles et l'induction de comportements sexuels comme le positionnement

en lordose. Chez l'éléphant d'Asie femelle, l'acétate de (z)-7-dodécène-1-yl est excrété dans l'urine pendant la période pré-ovulatoire afin d'attirer les partenaires sexuels (Gomez-Diaz & Benton, 2013).

Ainsi, les phéromones sont des substances chimiques d'une importance capitale chez de nombreuses espèces, en tant qu'agent de communication inter-individuelle à l'action prédisposée, i.e., indépendante de tout apprentissage. A ce jour, hormis la phéromone mammaire chez le lapin (cf. notre modèle, section D de cette introduction), la nature phéromonale des stimuli maternels impliqués dans le comportement de tétée chez les mammifères nouveau-nés est toujours en question. En effet, si il est connu que l'odeur du lait et d'odeurs maternelles provenant de la région mammaire, de la tétine/du mamelon, stimulent la réponse comportementale des nouveau-nés (Teicher & Blass, 1977), la nature chimique des odeurs concernées n'est que rarement connue et, de fait, ces signaux sont encore moins testés quant à leurs caractéristiques phéromonales. Un composé isolé de la salive de rats par chromatographie en phase gazeuse, couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS), appelé le disulfure de diméthyle (DMDS), s'avère déclencheur du comportement typique de prise orale des tétines chez des rats âgés de 3-5 jours, dans une certaine limite (50% de réponse par rapport à la réponse à des tétines intactes) (Pedersen & Blass, 1982). Le DMDS n'a pas été trouvé dans le liquide amniotique de ratte, suggérant que son activité serait indépendante d'une exposition prénatale (Blass, 1990). Dans l'espèce humaine, l'odeur des seins, du lait et du colostrum suscite chez les nourrissons des réactions comportementales et psychophysiologiques spécifiques, mais à ce jour si des composés ont été proposés en termes d'activité singulière, comme l'androsténone (Loos et al., 2014), l'existence de molécules/bouquet de molécules répondant au qualificatif strict de phéromone de mammifère n'a pas été démontrée.

#### *4. Apprentissage olfactif et comportement néonatal*

En éthologie et psychobiologie, l'apprentissage classique, dit aussi associatif ou pavlovien, est un processus par lequel un stimulus initialement neutre (dit stimulus conditionné, SC) devient pertinent pour un individu après association avec autre stimulus, lui déjà pertinent, de façon généralement prédisposée (stimulus inconditionnel, SI), qui agit comme agent renforçant. Souvent, et particulièrement dans le cas des apprentissages appétitifs, pour que l'apprentissage soit efficace il est nécessaire que l'association SC + SI, dite conditionnement, soit répétée plusieurs fois dans le temps, autrement dit nécessite de nombreux essais. Par exemple, dans l'expérience princeps

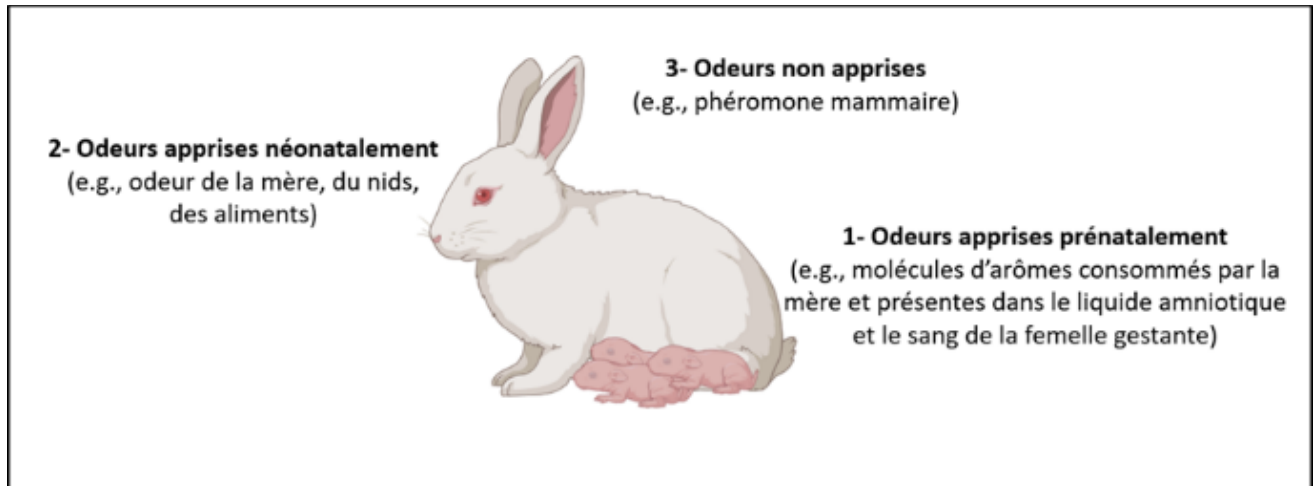
d'Ivan Pavlov, menée auprès de chiens, le son d'une cloche (SC) parvenait à être associé à la présentation de nourriture (SI) et à déclencher une réponse de salivation (réponse conditionnée, RC) équivalente à celle initialement engendrée par le SI seul (réponse inconditionnelle, RI) qu'après plusieurs sessions quotidiennes d'expositions au SC+SI, sur plusieurs jours enchainés (Rehman et al., 2024). L'apprentissage classique permettant l'apprentissage d'un SC par couplage à un SI, dit apprentissage de premier ordre, peut parfois conduire à un apprentissage de second ordre. Dans ce cas, le SC1, une fois appris, est utilisé pour faire apprendre un SC2 par association non pas avec le SI, mais avec le SC1 (Rehman et al., 2024).

Dans le cas des apprentissages olfactifs associatifs classiquement étudiés, c'est généralement une odeur qui joue le rôle du SC et est associée à un SI mono- ou multi-sensoriel générant un ressenti agréable (prise alimentaire, stimulus tactile, chaleur) ou désagréable dans le cas des apprentissages aversifs (choc électrique, malaise gastrique). Dans la nature, les animaux associent des stimuli olfactifs pertinents pour leur survie avec l'environnement chimique et physique qui les entoure. Et les nouveau-nés, bien qu'encore en partie immatures, se révèlent très performants pour acquérir ainsi des informations nouvelles. Dans l'environnement postnatal, ils perçoivent habituellement les stimuli émanant de la mère ou du nid comme étant favorables (y compris lorsqu'ils ne le sont - en fait - pas, comme chez le raton dans les premiers jours de vie néonatale; (Sullivan et al., 1986)). Par exemple, l'association d'une odeur avec l'administration de lait maternel pendant les 60 min qui composent la première heure suivant la naissance, induit chez le raton l'apprentissage de l'odeur en question et, *in fine*, une mobilité accrue en présence de l'odeur apprise (Miller & Spear, 2009).

La réponse néonatale à certaines odeurs maternelles peut parfois même découler d'apprentissages établis avant la naissance. Dans ce cas, le nouveau-né est exposé aux odeurs de manière en partie passive (apprentissage passif, « mere exposure ») avant la naissance, sans qu'il y ait nécessairement de renforcement explicite ou de lien associé à une autre stimulation (Miller & Spear, 2009). Des études ont montré qu'il existe une certaine continuité chimique olfactive entre l'environnement fœtal et néonatal du nouveau-né, qui contribue à son attraction vers certaines odeurs dites parfois "signatures" de la mère. Par exemple, l'application sur une tétine rendue inactive par lavage, de salive et de liquide amniotique en provenance de la mère, restaure le comportement de succion chez des rongeurs (Teicher & Blass, 1977; Logan et al., 2012). Ce

phénomène est d'autant plus pertinent que, durant la mise-bas et avant la première tétée, le comportement naturel des femelles rongeurs consiste à sectionner la poche amniotique, lécher le petit puis son propre abdomen, déposant ainsi du liquide amniotique, de la salive et du lait sur son corps et ses tétines (Logan et al., 2012). La modification de la composition chimique du liquide amniotique en y injectant du citral, une odeur citronnée, dans l'environnement prénatal, en plus d'une exposition au citral pendant une heure à la naissance, attire les rats spécialement vers des tétines imprégnées de citral (Pedersen & Blass, 1982). En utilisant la technique de GC-MS, des études ont montré la présence de 3 composés présents dans le liquide amniotique de rattes mais également retrouvés dans le lait, l'abdomen et les tétines de rattes qui sont: l'éthylbenzène, le benzaldéhyde, et l'alcool benzylique. Dans une procédure de test en labyrinthe (Y maze), les rats montrent une attirance pour le mélange de ces trois composés dans les mêmes proportions que dans le liquide amniotique (Sreng et al., 2017). Cette continuité chimique périnatale amenant les nouveau-nés à répondre à certaines odeurs apprises prénatalement est un mécanisme adaptatif maintenant largement décrit chez les mammifères au sens large (rongeurs, ongulés, félidés, primates, et lagomorphes) (Teicher & Blass, 1977; Pedersen & Blass, 1982; Hepper, 1991; Schaal et al., 1995; Coureaud et al., 2002).

Bien que cela ait été longtemps ignoré dans l'histoire des sciences, il est donc maintenant clairement documenté, depuis quelques décennies (cette introduction n'en donne qu'un aperçu très limité), que l'olfaction joue un rôle prépondérant dans la communication mère-jeune chez les mammifères, notamment côté jeune pour permettre au nouveau-né d'interagir avec la mère et le corps de celle-ci afin de trouver rapidement et efficacement la/les structure/s source de lait et de pouvoir s'alimenter. Cette réactivité néonatale aux odeurs maternelles peut résulter de processus d'apprentissages fonctionnels pour certains dès la vie fœtale, pour d'autres dès les premiers instants de vie néonatale. Bien que moins documentée dans la littérature, elle peut aussi découler de la réactivité prédisposée (i.e., non apprise) à certaines odeurs. Le lapin est un modèle particulièrement favorable à l'étude de ces différents processus, car le lapereau répond à la naissance à la fois à des signaux appris et à au-moins un signal non appris, la phéromone mammaire (Figure 1 et section D de l'introduction).



*Figure 1: Catégories de signaux olfactifs auxquels les lapereaux peuvent répondre comportementalement à la naissance suite à leur perception sur le corps maternel (dessin original de M.S. Hjeij effectué avec Biorender).*

## *B. Perception olfactive : qualité et seuils de détections*

La perception olfactive désigne l'aptitude d'un individu à détecter et à discerner les odeurs. La première étape en est la liaison des molécules odorantes avec les récepteurs olfactifs (ROs) exprimés par les neurones sensoriels olfactifs (NSO) situés dans la cavité nasale. Viennent ensuite le traitement et l'intégration des signaux par le bulbe olfactif et les cortex olfactifs, puis par l'ensemble des aires cérébrales concernées. A la simple perception olfactive, s'ajoutent alors une interprétation, un ressenti et une éventuelle prise de décision et action. Ces différents aspects de la perception olfactive (liaison, transmission, intégration/détection, identification/reconnaissance, réponse comportementale) sont résumés dans la Figure 2. Comme tous les processus sensoriels, ces processus sont influencés par plusieurs facteurs internes tels que l'âge, le sexe, l'état motivationnel (faim, fatigue, rythme circadien d'activité), l'expérience, ainsi que par des facteurs externes tels que les paramètres physico-chimiques des molécules, la présence de mélanges, les conditions atmosphériques (Wackermannová et al., 2016). Dans cette partie, je décris les principaux processus impliqués dans la perception des odeurs et l'impact soit de molécules seules soit de mélanges.

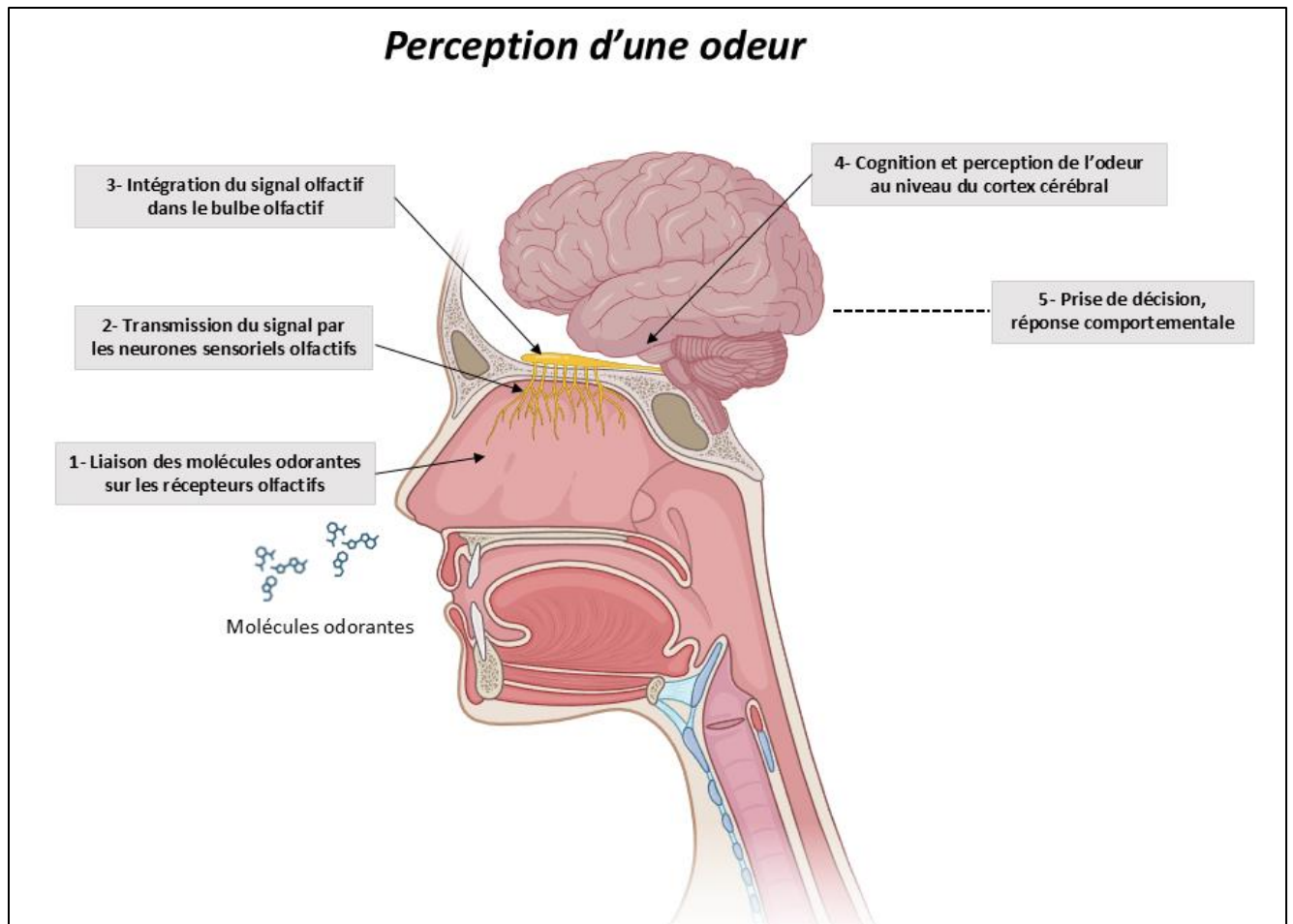


Figure 2: Schéma illustrant la perception des odeurs chez les mammifères, allant de la périphérie au système cérébral central et au comportement (dessin original de M.S. Hjeij effectué avec Biorender).

### 1. Les processus de la perception olfactive

La perception implique la détection d'une source odorante puis la discrimination qualitative de cette source. Détection et discrimination constituent la base de la perception olfactive qu'il y ait ou pas identification et reconnaissance de l'odeur en question. Le système olfactif est particulièrement compétent dans la réalisation de ces deux tâches. Une étude a estimé que l'Homme pourrait discriminer environ 1 trillion de stimuli olfactifs (Bushdid et al., 2014). La tâche de discrimination contient intrinsèquement la reconnaissance de la qualité odorante comme étant différente d'une autre, même si cette reconnaissance ne se traduit pas systématiquement par une identification verbalisée. Quand elle a lieu, l'identification fait généralement appel à la mémoire, qui permet de contextualiser l'odeur perçue par rapport à nos expériences passées (Figure 2). L'identification des odeurs est ainsi dépendante de processus cognitifs qui dépassent la



sensorialité olfactive, et est notamment dépendante de la culture et de l'expérience olfactive d'un individu (Shu et al., 2007). L'acuité olfactive mesure la capacité de percevoir et d'identifier les odeurs avec précision.

Étudier la perception des odeurs chez les animaux implique, à l'échelle de l'organisme entier, d'observer les changements comportementaux exprimés en réponse à un stimulus odorant, particulièrement lorsque ce dernier revêt une valeur significative pour l'animal. Si cette valeur biologique n'est pas intrinsèque (comme pour les phéromones), cela nécessite au préalable d'induire un apprentissage en renforçant le lien entre le stimulus olfactif et un autre stimulus (apprentissage associatif) et/ou un comportement (apprentissage opérant). L'état de jeûne, en stimulant la libération d'hormones telles que le neuropeptide Y, optimise l'acuité olfactive des animaux (Negroni et al., 2012), d'où la nécessité de prendre en compte l'état de faim de animaux lors des apprentissages et des tests olfactifs (Aimé et al., 2007, 2012). En outre, la sensibilité olfactive chez les mammifères, y compris l'Homme, est déjà améliorée par de simples expositions répétées à l'odeur en question (par mere exposure), sans renforcement (Kass et al., 2016; Woo et al., 2006). Comme pour l'apprentissage, cela implique des phénomènes de plasticité se produisant au niveau périphérique et cérébral (Bonzano et al., 2014; Baly, 2021) (cf. cas du lapereau section D.3 de l'introduction).

Un test classiquement utilisé pour identifier les performances olfactives humaines est la détermination du seuil de détection. Il s'agit de la plus basse concentration à laquelle l'odeur étudiée peut être détectée par un individu. Chez l'Homme, on parle de seuil de détection et, de façon complémentaire, de seuil de reconnaissance (ou perception). Ce dernier constitue la plus basse concentration permettant de reconnaître l'odeur et de lui attribuer un nom (Laska & Ringh, 2010). Chez les animaux non humains, ces deux seuils sont généralement confondus et, du coup, très délicat voire impossible à séparer. Étudier le seuil de détection repose sur la présentation d'un odorant, appris ou non, à différentes concentrations décroissantes. La concentration de l'odorant est généralement indiquée en unités de concentration diluée par parties par million (ppm), parties par milliard (ppb), parties par billion (ppt) et parties par quadrillion (ppq), valant respectivement des fractions de  $10^{-6}$ ,  $10^{-9}$ ,  $10^{-12}$  et  $10^{-15}$ . En phase liquide, les unités utilisées pour les concentrations sont des grammes, des moles ou des pourcentages par volume de liquide. Des formules permettent de convertir des concentrations en phase liquide en phase vapeur, ou

inversement. Ainsi, si la méthode de présentation du stimulus sous forme gazeuse semble la plus précise et la plus proche de la réalité (Cometto-Muñiz et al., 2003), il faut garder à l'esprit que tant les calculs en phases gazeuses que ceux permettant la conversion de la phase liquide à la phase gazeuse restent des estimations.

Les animaux terrestres et aquatiques ont souvent des seuils de détection très bas (Hoye et al., 2007; Tabuchi et al., 2013). Les souris par exemple sont capables, après apprentissage, de détecter un composé odorant, le burgeonal, jusqu'à 0,1 ppq, constituant le plus bas seuil de détection pour un odorant appris à ce jour. Ce composé porte un intérêt pour les recherches en reproduction parce qu'il est présent dans le sperme humain et serait impliqué dans l'attraction chimiotaxique de ce dernier pour l'ovocyte (Larsson & Laska, 2011). Dans la même étude, les souris ont été testées pour 6 autres aldéhydes du sperme humain pour lesquels les seuils de détection étaient de l'ordre de 0,01 ppm. Ainsi, chez la même espèce, le seuil diffère selon la molécule. Mais il peut varier selon l'espèce et la signification biologique que l'animal accorde au stimulus. Prenons l'exemple de la triméthylthiazoline (TMT), un composé retrouvé dans les fèces du renard roux. Une étude a montré que le seuil de détection de cette molécule par le rat, proie naturelle du renard, est de l'ordre de 0,04 à 0,10 ppt; ces valeurs correspondant au seuil le plus bas rapporté chez cette espèce (Laska et al., 2005). Par contre, trois espèces de primates non-humains, qui ne sont pas des proies naturelles du renard roux, se révèlent capables de détecter la TMT à des concentrations de l'ordre du ppb, cette sensibilité ne correspondant pas aux seuils olfactifs les plus bas rapportés pour ces espèces (Laska et al., 2005). Chez les chiens, l'olfaction est reconnue pour être extrêmement performante. Leurs capacités olfactives sont aujourd'hui utilisées dans le diagnostic de maladies telles que le cancer, le diabète, la cirrhose ou l'épilepsie, grâce à leur aptitude à détecter certains composés organiques volatils (COV) présents dans les fluides corporels des patients, tels que l'acétone (pour le diabète), le diméthyl trisulfide (pour le cancer), ou encore la triméthylamine (pour la cirrhose) (Shirasu & Touhara, 2011; Wackermannová et al., 2016). Par ailleurs, plus performants que tous les matériels de mesures disponibles à ce jour, les chiens sont très efficaces et fiables dans la recherche de drogues et d'explosifs (Wackermannová et al., 2016). Une étude a démontré que, après conditionnement sans contraintes restrictives, les chiens peuvent détecter l'acétate d'amyle à des concentrations comprises entre 1,14 et 1,9 ppt (Walker et al., 2006). Ce seuil est 30 à 20 000 fois plus bas que celui rapporté dans une autre étude qui avait utilisé une

technique de renforcement négatif avec privation d'eau et utilisation de chocs électriques (Krestel et al., 1984). Cette différence illustre l'influence du type d'apprentissage sur la sensibilité olfactive.

En outre, la qualité olfactive engendrée par la perception d'une molécule peut changer selon la concentration de la molécule en question (Bontempi et al., 2022). Ainsi, une odeur à forte versus faible concentration peut parfois être perçue différemment. La concentration peut, de fait, affecter la valeur hédonique du stimulus (Bontempi et al., 2022). Ceci pourrait être dû au fait qu'une plus forte concentration recrute un plus grand nombre de ROs, contribuant au changement qualitatif perçue de la molécule (Coureaud et al., 2004; Hu et al., 2020).

Il est à noter que les données des études sur la sensibilité olfactive et les seuils de détection varient souvent selon plusieurs facteurs, notamment les méthodes de mesure, les conditions expérimentales et les sujets de l'étude. Cela n'aide donc pas à extraire des généralités à partir des études concernées. Ceci étant, leur intérêt est primordial pour pointer l'efficacité et la plasticité du système olfactif.

## *2. Molécule odorante et mélanges d'odorants*

La perception olfactive d'une molécule présentée seule dépend de ses caractéristiques physico-chimiques et de sa concentration. Parmi les caractéristiques physico-chimiques, la volatilité occupe une place importante. La volatilité est liée au poids moléculaire et à la pression de vapeur saturante : moins la molécule est lourde plus elle est volatile et présente une pression de vapeur saturante importante. Un odorant volatil atteint la cavité nasale plus rapidement, mais ce n'est pas un gage de meilleure sensibilité. En effet, le système olfactif périphérique est particulièrement bien adapté à la détection des composés faiblement volatils de façon à compenser, au moins en partie, leur lente propagation dans l'air (Williams & Ringsdorf, 2020). Par ailleurs, les molécules odorantes sont généralement constituées de chaînes carbonées de 5 à 12 carbones, qui leurs confèrent un caractère plutôt hydrophobe et ne facilite pas leur traversée du mucus pour atteindre les NSO. Ce caractère hydrophobe rend difficile leur dilution en phase liquide et demande une pré-dilution dans l'alcool avant toute dilution aqueuse, voire d'être diluées dans l'huile minérale. La structure chimique de la molécule est un facteur indissociable de la qualité de l'odeur à tel point qu'il existe actuellement plusieurs répertoires associant des molécules à une odeur en fonction de leur structure (Sharma et al., 2021: <https://olfab.iiita.ac.in/olfactionbase/odor>). Les structures chimiques des molécules odorantes peuvent porter des fonctions très variées (cétones,

esters, aldéhydes, amines, sulfures, thiol, etc.). Certaines fonctions portent des odeurs caractéristiques telles que la fonction cétone caractérisée par l'odeur agréable de fruits ou de fleurs, et la fonction thiol sentant au contraire l'œuf pourri. Cependant, une même molécule peut être perçue différemment selon sa forme (isomérisation) et sa chiralité. Par exemple la S-carvone génère la perception humaine de l'odeur du cumin tandis que la R-carvone, son énantiomère, sent la menthe douce.

Une des difficultés de compréhension fine de l'olfaction découle du fait que, dans le quotidien des organismes, le système olfactif ne traite que très rarement, pour ne pas dire jamais, des molécules odorantes émanant seules de l'environnement et stimulant seules le système olfactif. L'environnement chimique est en effet par nature très complexe et changeant. Le système olfactif est donc amené à traiter des mélanges, plus ou moins complexes, de composés volatils présents par dizaines, centaines ou milliers, autour de l'individu. Prenons l'exemple de l'odeur de rose, constituée de 350 à 450 molécules chimiques odorantes. Lorsque ces molécules sont inhalées, des phénomènes de compétitions peuvent avoir lieu entre molécules au niveau périphérique selon la forme, la structure, la concentration des odorants, impliquant les ROs et les enzymes du métabolisme des xénobiotiques (EMXs) (voir la section C à venir). A l'étage perceptif, des processus de synergie, de masquage, de génération de percepts analytiques versus synthétiques peuvent également intervenir (Thomas-Danguin et al., 2014; Romagny et al., 2018). D'une façon générale, la perception d'un mélange est dite homogène lorsqu'une seule odeur est perçue dans le mélange, ou hétérogène lorsque plusieurs odeurs sont perçues dans le mélange (Figure 3). Dans le cas d'un mélange homogène, soit un seul composé voit son odeur dominer celles des autres composés présents dans le mélange, soit tout ou partie des composés engendrent collectivement la perception d'une qualité singulière, distincte de celles de chacun des composés, la perception est alors synthétique. Dans le cas d'un mélange hétérogène, les odeurs de tout ou partie des composés qui constituent le mélange sont perçues, la perception est dite analytique. Dans certains cas la perception est mixte, et qualifiée de partiellement synthétique: du mélange émane à la fois la qualité de tout ou partie des odorants, mais aussi une qualité propre au mélange, différente de celles des constituants. C'est par exemple le cas du mélange AB (A, isobutyrate d'éthyle, odeur de fraise pour l'Homme; B, éthyl maltol, odeur de caramel pour l'Homme) qui, au ratio 30/70 de A/B, engendre la perception synthétique de l'ananas chez l'Homme (Berre et al., 2008; Barkat et al., 2012). Ce même mélange, au même ratio, engendre d'ailleurs également une

perception au moins partiellement synthétique chez d'autres espèces animales comme les rats, les souris et les abeilles (revue dans Coureaud et al., 2022b) ainsi que chez les lapins nouveau-nés (cf. les détail donnés dans la partie D).

Ainsi, la perception d'une odeur est un processus très complexe qui dépend de multiples facteurs internes et/ou externes à l'individu parmi lesquels les caractéristiques physico-chimiques d'une molécule occupent une place très importante, dans un contexte de mélanges avec d'autres molécules, ou pas.

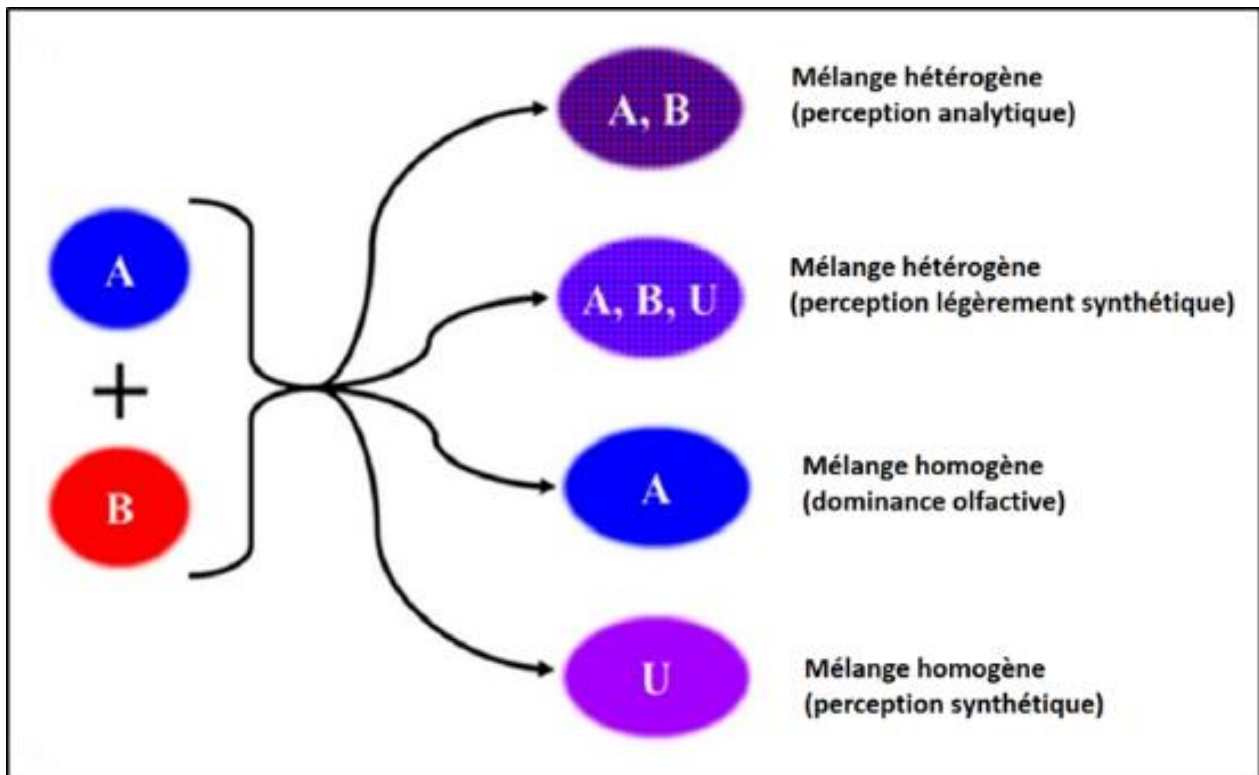


Figure 3: Figure simplifiée de la perception théorique de mélanges binaires constitués d'une molécule A et d'une molécule B. La lettre U étant une odeur nouvelle perçue différemment de l'odeur de A et B (figure tirée de Thomas-Danguin et al., 2014).

### *C. Mécanismes sous-tendant la perception olfactive: focus sur le métabolisme des odorants*

Le processus aboutissant à la perception d'une odeur chez les mammifères peut être initié par deux voies: la voie orthonasale, basée sur l'inhalation de molécules via le nez/museau selon les espèces, et la voie rétronasale basée sur la libération dans la bouche de molécules associées à de la nourriture par exemple, qui une fois mastiquée conduit au passage des molécules en question jusqu'à la cavité nasale via l'arrière du palais. Dans cette section, je décris la structure et la fonction du système olfactif chez les vertébrés, de la périphérie vers les voies centrales, tout en mettant l'accent sur les événements de métabolisme qui ont lieu autour des ROs via l'action des EMXs.

#### *1. Structure et fonction du système olfactif périphérique*

Le système olfactif périphérique qui échantillonne l'information sensorielle dans l'environnement se situe dans la cavité nasale. Il comprend un système principal, la muqueuse olfactive (MO) qui tapisse les cornets olfactifs, l'organe voméronasal, l'organe septal et les ganglions de Grueneberg (Graziadei, 1977).

L'organe voméronasal, appelé également organe olfactif secondaire ou organe de Jacobson, présent chez les amphibiens, les reptiles et les mammifères, a longtemps été considéré comme spécialisé dans la détection des phéromones. On sait aujourd'hui que c'est faux, il peut traiter des phéromones comme des odeurs communes, et il en est de même pour le système olfactif principal (Baum, 2012; Charra et al., 2012). Chez l'Homme, l'organe voméronasal est vestigial et sa croissance régresse durant la vie fœtale (Dénes et al., 2015). Cela est parfois interprété comme lié au fait que l'Homme est devenu un être sociable communiquant avec son entourage principalement via le langage et la vision, et de façon moindre via l'olfaction, du moins en apparence. Mais cette interprétation était surtout évoquée quand on pensait que le voméronasal était le système unique de traitement des phéromones, ce qui s'est - comme dit ci-dessus - avéré erroné.

L'organe septal, appelé aussi organe de Maserà, et les ganglions de Grueneberg, ont été étudiés chez un nombre limité de mammifères, dont les rongeurs (Miragall et al., 1984). Chez l'Homme, ils sont quasiment inexistantes. Le rôle précis de ces deux entités n'est pas encore bien compris. Cependant, ils portent des ROs, et seraient plutôt impliqués dans des réponses d'alertes engendrées par certaines molécules, dont des phéromones (Grosmaître et al., 2009; Matsuo et al., 2012).

La muqueuse olfactive (MO) nous intéresse particulièrement dans cette thèse (cf. Figure 4). C'est l'organe olfactif principal commun à tous les vertébrés. Elle est composée de deux hémimuqueuses, droite et gauche, séparées par le septum. La MO est organisée en cornets olfactifs (4 cornets chez les rongeurs et les lagomorphes, 3 chez l'Homme) alors que chez l'Homme, elle se réduit à une lame située au sommet de la cavité nasale. La couche qui est en contact direct avec l'air est l'épithélium olfactif (EO). Il s'agit d'une couche de cellules stratifiées formée de 4 types de cellules, décrites ci-après (Moran et al., 1982; Morrison & Costanzo, 1990, 1992).

- les cellules sustentaculaires, aussi dites de soutien, sont des cellules cylindriques à jonctions serrées ayant, au niveau de leur pôle apical, des microvillosités. Elles contiennent de nombreux organites (mitochondries, appareil de golgi, etc.). Leur fonction est le soutien et la structuration de l'épithélium ainsi que la protection des NSO.
- les cellules microvillaires sont des cellules possédant moins de réticulum endoplasmique et des microvillosités plus régulières que les cellules sustentaculaires, ayant probablement un rôle dans l'immunité (Baxter et al., 2021).
- Les NSO sont des neurones dont les dendrites se projettent entre les jonctions serrées des CS pour s'ouvrir à la lumière de la cavité nasale par des cils portant des ROs. Chaque NSO porte un seul type de RO mais un RO peut lier différentes molécules odorantes. A l'opposé, les axones des NSO se regroupent en faisceaux de 10 à 100 axones au niveau de la *lamina propria* et traversent la lame criblée de l'os éthmoïde afin de transmettre le signal olfactif aux neurones de second ordre se trouvant dans le bulbe olfactif (premier relais cérébral).
- Les cellules basales sont des cellules se trouvant dans la partie profonde de l'EO hautement actives dans la régénération des NSO et des cellules sustentaculaires (P. P. Graziadei et al., 1979). Le rôle des cellules basales, essentiel, est de permettre le maintien de la couche de NSO constamment exposé à l'environnement externe. Chez l'Homme, les NSO se régénèrent à partir des cellules basales tous les 30 à 120 jours (Shepherd, 2010).

En dessous de l'EO, il y a la couche de la *lamina propria*, qui est une couche de tissu conjonctif dans laquelle se trouvent les faisceaux des axones des NSO ainsi que les glandes de Bowman. Ces dernières sont des glandes séreuses ayant pour rôle de sécréter et libérer le mucus olfactif dans la cavité nasale à travers des conduits qui traversent l'EO. Le mucus qui tapisse l'EO contient essentiellement de l'eau (95%), des électrolytes, des lipides et des protéines (Bansil &

Turner, 2018). Les protéines du mucus olfactif remplissent diverses fonctions, allant de l'hydratation de l'EO à la protection contre les agents délétères, tels que les bactéries toxiques ou pathogènes. En outre, ces protéines sont aujourd'hui reconnues pour leur implication dans l'olfaction, notamment les EMXs (décrites en section 4). Le mucus olfactif est souvent mélangé avec le mucus respiratoire, provenant des cellules sécrétrices de l'épithélium respiratoire à la transition entre les deux épithéliums. Ces deux mucus sont souvent confondus dans les études ou appelés sous le terme général de "mucus nasal" (MN) (Casado et al., 2005; Débat et al., 2007; Yoshikawa et al., 2018a). L'épithélium respiratoire est une structure non neuronale, précédant l'EO, qui sert à filtrer, réchauffer et humidifier l'air que nous respirons. Sa surface, eu égard à celle de la MO, est particulièrement importante dans la cavité nasale de l'être humain (Kia'i & Bajaj, 2024).

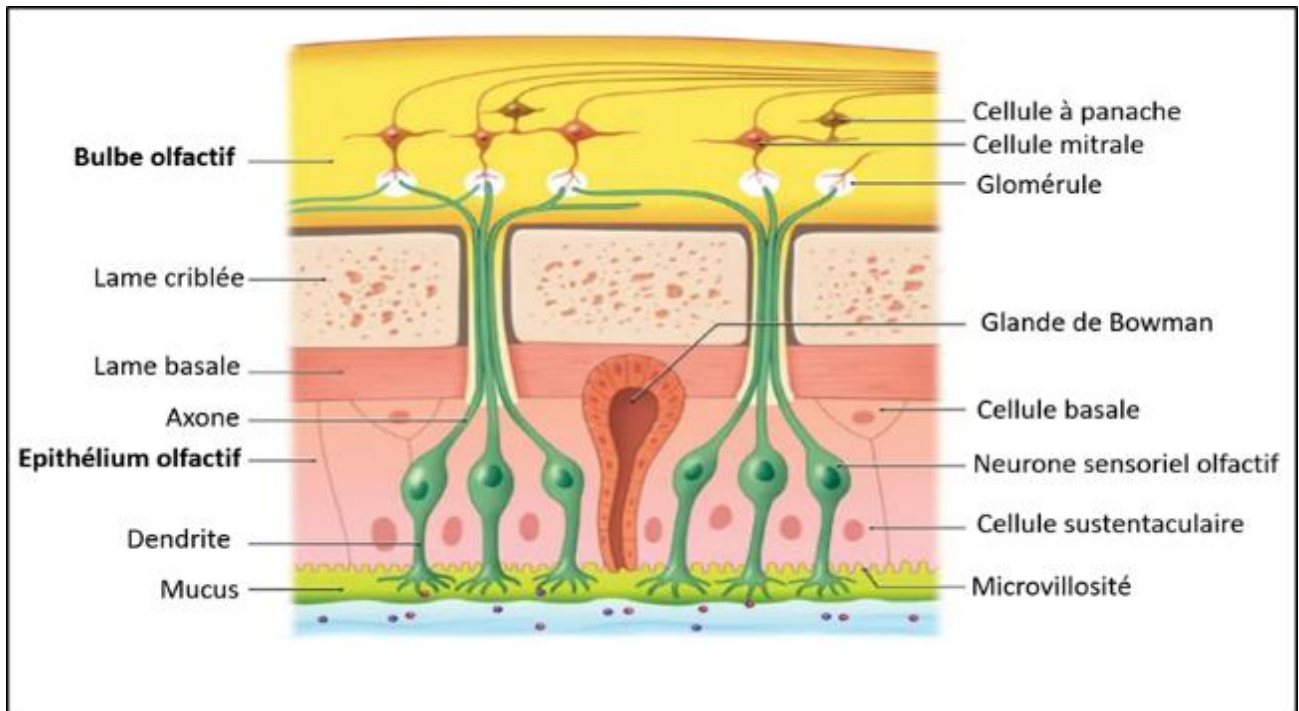


Figure 4: Structure de l'épithélium olfactif et du bulbe olfactif (figure adaptée de O'Brien et al., 2012).

## 2. Structure et fonction du système olfactif central

Le bulbe olfactif (BO) est le premier relais cérébral de l'information olfactive. Se reposant sur la lame criblée, le BO est constitué de deux héli-bulbes relayant les axones des NSO en provenance de l'héli-muqueuse droite et gauche. Les faisceaux des axones des NSO (faisceaux



de nerfs) se projettent dans le BO dans des glomérules dans lesquels ils forment des jonctions synaptiques avec les cellules mitrales et les cellules à panaches (O'Brien et al., 2012) (Figure 4). Les axones des NSO exprimant le même type de ROs se projettent dans les mêmes glomérules. Environ 5600 glomérules ont été trouvés chez l'Homme, 6300 chez le lapin (Maresh et al., 2008; Royet et al., 1998).

Les cellules mitrales et à panaches transmettent l'information à de nombreuses structures adjacentes qui sont regroupées sous le nom de "cortex olfactif primaire". L'absence de relais thalamique entre le BO et les aires olfactives primaires constitue une particularité du système olfactif, permettant un relais direct de l'information (Shepherd, 2005). Le cortex olfactif primaire est constitué de 4 principales voies impliquées dans la perception et le traitement cérébral initial des odeurs: 1- le cortex piriforme, site de projection principal des afférences en provenance du BO, 2- le tubercule olfactif, 3- le noyau olfactif antérieur et 4- le noyau entorhinal. Ces voies projettent dans le système limbique, via des régions telles que l'amygdale, l'hippocampe, les noyaux de l'hypothalamus et le thalamus. Les composantes du système limbique jouent un rôle crucial dans les processus liés à l'émotion, la motivation, l'apprentissage et la mémoire (Roi, 2013). En conséquence, le traitement des signaux olfactifs est en grande partie inconscient et lié aux émotions dès ses premières étapes (Catani et al., 2013). Un nombre important de neurones provenant du cortex piriforme et du thalamus se projettent ensuite dans le cortex olfactif dit "secondaire", constitué du cortex orbitofrontal et du cortex insulaire (Shepherd, 2007; Roi, 2013). Ces derniers permettent une intégration multimodale de la perception olfactive, combinant informations olfactives et informations provenant d'autres modalités comme le goût, la vue et le toucher, ainsi que les aspects émotionnels associés (Figure 5).

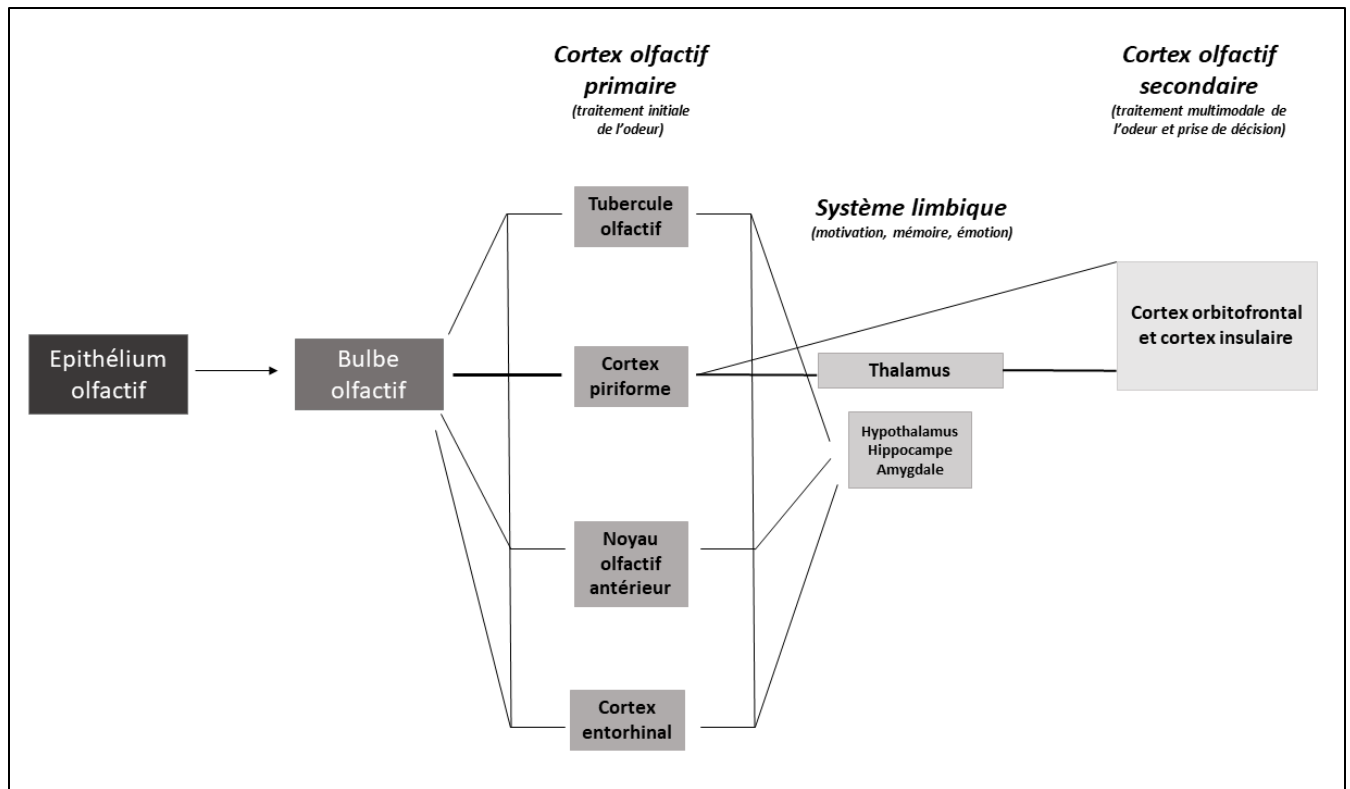


Figure 5: Schéma des principales structures du système olfactif depuis la périphérie nasale jusqu'au cortex olfactif secondaire (figure adaptée de Roi, 2013).

### 3. Les récepteurs olfactifs et la genèse du message sensoriel périphérique

Les ROs sont portés par les cils des NSO et baignent dans le mucus olfactif. Ils font partie de la superfamille des récepteurs couplés aux protéines G (ou RCPG) qui constituent 2 à 4% du génome des mammifères. En 2004, Linda Buck et Richard Axel ont eu le prix Nobel pour leur découverte d'un large panel de gènes chez le rat codant pour presque une centaine de RO différents (Buck & Axel, 1991). Aujourd'hui, 1 000 gènes codant pour les RO ont été découverts chez les rongeurs et 400 chez l'Homme (Niimura, 2012). Il existe par ailleurs des polymorphismes génétiques au sein d'une même espèce. Par exemple, un dérivé de la testostérone, l'androsténone, peut être perçu chez l'Homme de manière désagréable (sueur, urine) ou agréable (sucré ou florale) ou même inodore à forte concentration. Cette différence de perception serait due à une variation génétique du récepteur OR7D4 (Keller et al., 2007).

Les ROs jouent un rôle au-delà du nez. Un grand nombre de ROs ont récemment été trouvés en position ectopique (ROEs), c'est-à-dire en dehors de leur localisation habituelle au niveau de l'épithélium olfactif (revue dans Franco et al., 2024), contribuant à plusieurs aspects régulateurs

et physiologiques dans le corps, tels que la reconnaissance cellule-cellule, la migration, la prolifération, le cycle apoptotique, l'exocytose, etc (Massberg & Hatt, 2018). Le premier ROE a été découvert dans les testicules, au niveau des spermatozoïdes; il serait impliqué dans leur guidage chimiotactique vers l'ovule (Parmentier et al., 1992). Les ROEs sont également exprimés dans certaines cellules cancéreuses et même dans les artères, causant l'accumulation de plaques et la formation d'athérosclérose (Neuhaus et al., 2009; Orecchioni et al., 2022). Les RCPG étant la cible de 40% des molécules thérapeutiques, mieux comprendre leur signalisation intracellulaire dans l'ensemble des organes et structures les exprimant apparaît d'une importance capitale.

Les ROs se composent de sept domaines hélicoïdaux transmembranaires (TM) liés par trois boucles extracellulaires et trois boucles intracellulaires avec un N-terminus extracellulaire et un C-terminus intracellulaire (Figure 6). Le motif d'acide aminé aspartate-arginine-tyrosine, qui est une caractéristique des RCPG, est retrouvé à l'intersection du domaine TM3 et de la boucle intracellulaire 3. Les TM1, TM2 et TM7 sont également tous conservés. La spécificité du site de liaison est déterminée selon les séquences en acides aminés hypervariables des domaines TM centraux (TM3 à 6) (Sharma et al., 2021). Cette poche de liaison permet des interactions hydrophobes entre les odorants et les ROs, du côté de la face extracellulaire de la membrane plasmique des cils olfactifs. La majorité des ROs sont dits orphelins, c'est-à-dire que leurs ligands ne sont pas encore connus. Mais un grand nombre de liaisons RO-ligand a été étudiée et caractérisée. Un RO peut être restreint à une seule molécule odorante ou avoir, *a contrario*, un spectre de liaison assez large (Saito et al., 2009). Ceci induit des phénomènes de compétition et d'inhibition impactant la perception, comme décrit dans la section B.2 (Reddy et al., 2018).

La fixation d'une molécule odorante dans leur poche de liaison entraîne une modification conformationnelle du RO, qui conduit à l'activation d'une protéine G intracellulaire. Cette dernière entraîne à son tour une cascade d'activation intracellulaire (voie de l'AMPc ou l'IP3) permettant la génération d'un potentiel d'action à l'origine du signal olfactif transmis le long des axones des NSO vers les glomérules du BO.

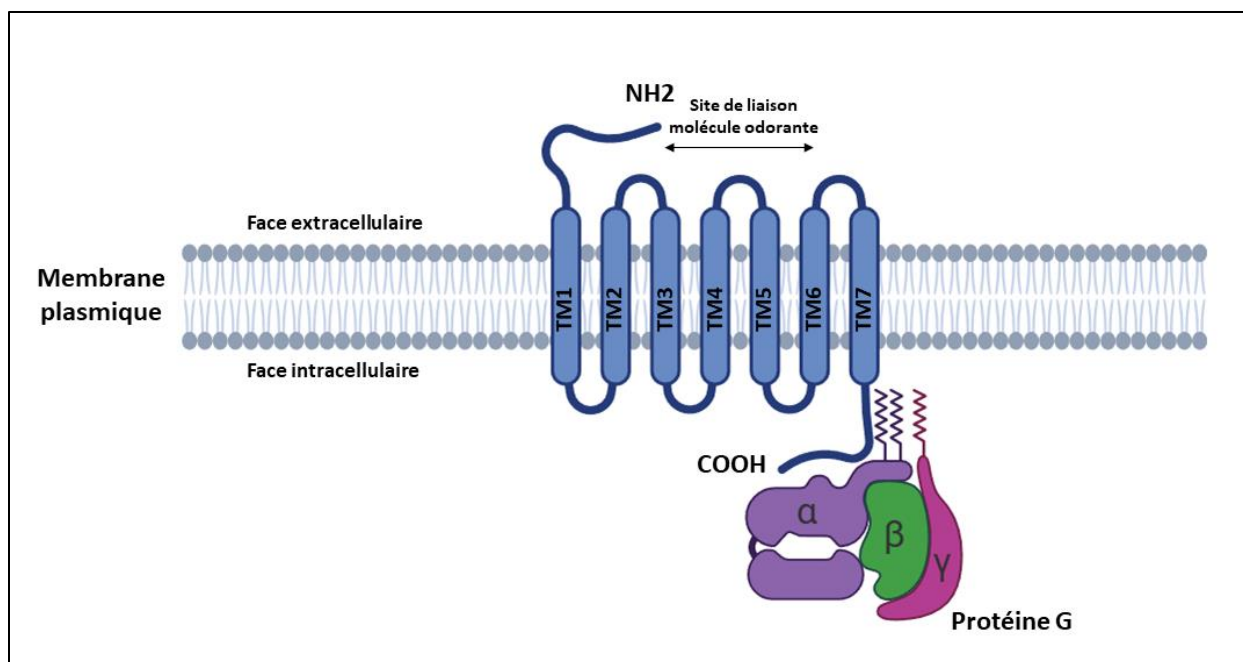


Figure 6: Le récepteur olfactif, un récepteur couplé à la protéine G (dessin adapté de Urbani et al., 2022 et réalisé avec Biorender).

#### 4. Les évènements péri-récepteurs

Le mot “évènements péri-récepteurs” a été proposé pour la première fois en 1984 par Getchell et collaborateurs. Il s’agit des mécanismes biochimiques qui permettent aux substances chimiques volatiles et non volatiles de l’environnement d’interagir avec les récepteurs sensoriels internes (Getchell et al., 1984). Au niveau du nez, et en particulier du mucus olfactif, deux acteurs entrent en jeu entre la molécule odorante et le RO: les protéines de liaison des odorants (odorant binding proteins, OBPs) et les enzymes métabolisant les xénobiotiques (EMXs). Ces deux acteurs transportent et biotransforment respectivement les molécules odorantes afin de réguler leur biodisponibilité et éviter la saturation des ROs. Ils peuvent également contribuer significativement à la modulation du signal olfactif et par conséquent impacter la perception de l’odeur en finale (Heydel et al., 2013, 2019). Dans cette partie, je décris ces deux acteurs péri-récepteurs actifs dans la MO en me concentrant sur les EMXs et l’effet du métabolisme des odorants sur la perception.

##### 4.1. Les protéines de liaison des odorants

Les OBPs sont des lipocalines à faible poids moléculaire (17-20KDa) sécrétées dans le mucus par les glandes de Bowman. Il s’agit d’une famille de protéines ayant pour rôle de transporter les molécules hydrophobes. Les premières OBPs ont été découvertes par Pelosi et

collaborateurs en 1982, en tant que protéines liant le 2-isobutyl-3-méthoxypyrazine, une molécule typique de l'odeur du clou de girofle (Pelosi et al., 1982). À ce jour, une seule OBP a été retrouvée dans le mucus humain, contre 3 chez le rat et le lapin. Les OBPs identifiées chez le lapin partagent des similitudes avec les OBP d'autres espèces (souris, bovins, porcs) mais aussi avec la lipocaline urinaire de souris appelée protéine urinaire majeure 4 (Garibotti et al., 1997). Bien que leur nombre dans le génome des mammifères soit comparativement limité par rapport à celui des insectes (> 20 OBP), les données disponibles indiquent que certains membres des lipocalines dans le mucus possèdent la capacité de lier des substances odorantes. Récemment, il a été montré qu'une réduction de la concentration de lipocaline 15 dans le mucus nasal humain est associée à une perte olfactive idiopathique par rapport à des patients ayant une olfaction normale (Ijichi et al., 2022).

Le rôle principale des OBPs est de lier, de manière réversible, les molécules odorantes qui sont hydrophobes au site de liaison hydrophobe des ROs, en les faisant circuler dans le mucus olfactif (Briand et al., 2000). Chaque sous-type d'OBP de rat semble être spécialisé pour reconnaître un répertoire distinct d'odorants (Löbel et al., 2002). L'OBP trouvée dans le mucus humain fixe un large panel de molécules odorantes avec une forte affinité pour les aldéhydes et les acides gras de grande taille (Briand et al., 2002). Chez les insectes, une séparation a été faite entre protéines liant des phéromones (PBPs) et protéines liant d'autres signaux chimiosensoriels (CSPs) (Tegoni et al., 2004). Chez les insectes, les OBPs seraient également impliquées dans la perception finale de l'odeur. Plusieurs études ont par exemple montré un changement de comportement chez les drosophiles après suppression ou altération de gènes d'OBPs (Shorter et al., 2016; Rihani et al., 2017).

Il n'est toujours pas clairement établi si les OBPs relarguent les odorants à proximité des ROs ou bien si se forme un complexe OBP-odorant-RO. En revanche, une étude a montré que les OBPs peuvent interagir et se lier aux ROs soit pour ramener l'odorant vers le site actif du RO soit, à l'inverse, pour éliminer les molécules odorantes après activation des ROs et limiter la saturation de ces derniers (Vidic et al., 2008). Les OBPs pourraient également rapprocher les molécules odorantes des EMXs, dont le rôle dans l'élimination ou la biotransformation des molécules odorantes est décrit ci-dessous.

#### *4.2. Les enzymes métabolisant les xénobiotiques*

Les xénobiotiques sont des molécules exogènes à l'organisme, telles que les molécules odorantes et les polluants. Ils peuvent être toxiques pour la MO et par conséquent pour le système nerveux central puisqu'il est en contact direct avec les NSO (Casado et al., 2005; Butowt et al., 2021). Ainsi, un système enzymatique de détoxification existe dans le système olfactif périphérique, au sein du mucus (Casado et al., 2005; Genter et al., 2006), dans les cellules de l'EO comme les cellules sustentaculaires et celles des glandes de Bowman, et dans les corps cellulaires et les cils des NSO (Getchell et al., 1993; Bogdanffy et al., 1999; Heydel et al., 2001; Mayer et al., 2009). Ce métabolisme des xénobiotiques comprend 3 phases, I, II et III, et consiste en l'action coordonnée d'enzymes et de transporteurs visant à désactiver et éliminer les xénobiotiques respectivement. Bien que l'organe métabolique majeur soit le foie, l'expression et l'activité des enzymes du métabolisme des xénobiotiques sont quasi-ubiquitaire : on les trouve en effet au niveau des reins, poumons, intestin, œsophage, peau, plexus choroïdes intraventriculaires (Strazielle & Ghersi-Egea, 2000) et également dans les tissus olfactifs (Heydel et al., 2013) (Figure 7). Dans certaines études, l'activité métabolique d'EMXs paraît même plus importante au niveau de la MO qu'au niveau du foie, liée à une expression préférentielle (quasi spécifique) de certaines EMXs dans l'EO (Lazard et al., 1991; Minn et al., 2005).

Les EMX de la phase I ont un rôle de fonctionnalisation : elles ajoutent ou libèrent un groupe fonctionnel à la molécule substrat (OH, COOH, NH<sub>2</sub>, etc.) en catalysant des réactions d'oxydation, de réduction ou d'hydrolyse ce qui a souvent pour effet également de la rendre plus polaire. Ce groupe d'enzymes comprend les cytochromes P450 (CYP), les aldéhydes déshydrogénases (ALDH), les aldo-keto-réductases (AKR), les aldéhydes oxydases (AOX), les carboxylestérases (CES), etc.

Les EMX de la phase II ont un rôle de conjugaison: elles conjuguent la molécule ou le métabolite formé par les EMX de la phase I avec des grosses molécules polaires comme le glutathion, l'acide glucuronique ou le sulfate afin de les rendre hydrophiles et faciliter leur excrétion. Cette phase regroupe les glutathion transférases (GSTs), les UDP-glucuronosyltransférases (UGT) et les sulfotransférases. Selon son degré de fonctionnalisation, le xénobiotiques peut directement être pris en charge par les enzymes de phase II.

La phase III des EMX est l'étape d'élimination : c'est l'étape qui permet d'excréter les métabolites hydrophiles en dehors de la cellule, par le biais de transporteurs. Cette phase comprend donc des protéines de transport membranaires comme la familles des protéines de résistance aux multidrogues (multidrug resistance protein) et les P-glycoprotéines ( Thiebaud et al., 2011; Ehlers et al., 2014).

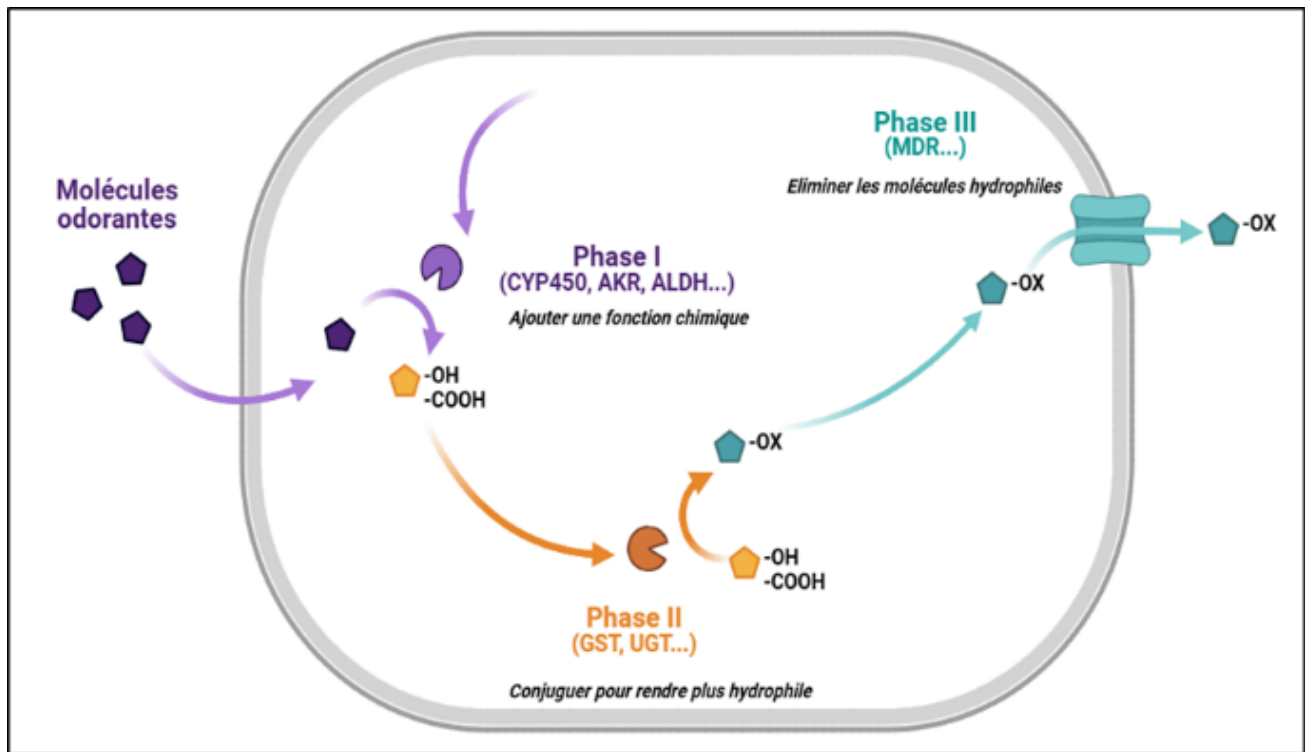


Figure 7: Illustration des 3 phases du métabolisme des xénobiotiques (dessin adapté de Heydel et al., 2013 et réalisé avec Biorender).

Les EMXs ont une fonction principale de détoxification en formant des métabolites hydrophiles afin de faciliter leur excrétion en dehors de la cellule, dans les liquides corporels d'évacuation comme la bile, l'urine ou le mucus olfactif. Cependant, ce processus peut parfois conduire à l'activation de certains xénobiotiques et donc induire une toxicité (Hinson et al., 1994). Tout comme dans le foie ou d'autres organes, l'expression des EMXs dans la MO peut être modulée par plusieurs facteurs (exposition à des xénobiotiques, âge, satiété, etc.). Par exemple, l'enzyme UGT2A1 atteint un niveau maximum d'expression en ARNm vers l'âge de 3 mois chez des rats, puis décroît avec l'âge (Leclerc et al., 2002). Le CYP2E1 est induit dans la MO de rats selon le statut nutritionnel (faim, jeûne) (Ling et al., 2004b). Cette enzyme est également induite en présence d'éthanol, d'acétone et de pyrazole chez de nombreuses espèces (rats, souris, lapins)

(Ling et al., 2004b). Chez le rat, un traitement systémique avec des inducteurs types des EMXs conduit à une régulation de l'expression et de l'activité de certaines EMXs de phase I, II et III dans la MO (Thiebaud et al., 2010). La modulation de l'action des EMXs par leur substrat est un point clé du processus de détoxication, puisque la plupart du temps, ce mécanisme induit leur expression et donc renforce leur efficacité. Très peu d'études ont exploré la régulation des EMXs au niveau olfactif. Une étude a montré chez la souris axénique que certaines EMXs étaient négativement régulées (CYP2A5 et UGT2A1) (François et al., 2016). Une exposition longue postnatale (1h/jour pendant 3 semaines) à l'odorant lylal n'a pas d'effet significatif sur l'expression de CYP1A2 et 1A5 ou des GSTs de classes alpha mu et pi (Cadiou et al., 2014).

### 5. *Impact des enzymes métabolisant les xénobiotiques sur la perception des odeurs*

Outre le rôle des EMXs dans la détoxication des tissus olfactifs, ces protéines ont un rôle significatif dans le traitement nasal des molécules odorantes et, *in fine*, dans la perception des odeurs. Il a été établi que la vitesse de formation de métabolites par les EMXs de la MO est de l'ordre de la centaine de milliseconde (si on retire les volumes dans le dispositif expérimental), ce qui est similaire à la vitesse de l'interaction ligand-RO. Cela a été montré grâce à la spectrométrie de masse par réaction de transfert de protons (PTR-MS) qui permet de suivre la production de métabolites en temps réel en présence du tissu olfactif (Robert-Hazotte et al., 2019, 2022). Le rôle des EMXs dans le métabolisme des molécules odorantes et l'arrêt du signal olfactif a été bien étudié chez les insectes. Le terme "ODEs" pour "Odorant degrading enzymes" a d'ailleurs été utilisé pour les EMXs impliqués dans la chimioperception (Chertemps et al., 2015; Steiner et al., 2017). Chez les mammifères, le terme "OMEs" pour "Odorant Metabolizing Enzymes" a récemment été utilisé (Faure et al., 2016) pour plusieurs raisons décrites ci-dessous.

#### *La participation au signal olfactif*

Comme vu ci-dessus, les acteurs enzymatiques peuvent produire des métabolites en ajoutant un groupement fonctionnel à la molécule initiale avec une vitesse compatible avec le mécanisme de réception. Le métabolite peut alors activer d'autres ROs et ainsi participer au signal olfactif global. Par exemple, une étude a montré (via l'utilisation d'inhibiteurs pharmacologiques) que les odorants de types aldéhydes sont oxydés en acides carboxyliques par les enzymes AOX2 et AOX3 présentes dans la MO de souris (Takaoka et al., 2022). Dans une autre étude, Nagashima et Touhara ont indiqué que l'acétate d'isoeugénol est biotransformé *ex vivo* par les CES en



isoeugénol dans le mucus nasal de souris. L'inhibition des CESs par un traitement au bis(4-nitrophenyl) phosphate ne permet plus la reconnaissance par les souris de l'acétate d'isoeugénol, après que celui-ci ait été appris par association avec une récompense sucrée, ce qui suggère un lien direct entre conversion enzymatique de l'acétyl-isoeugénol en isoeugénol et l'impact sur la qualité de l'odeur perçue (Nagashima & Touhara, 2010). Dans un modèle *in vitro* de cellules hétérologues exprimant des ROs en présence ou en absence d'une CES de type 1d, il a été montré par mesure en temps réel des changements de niveau d'AMPC (réponse olfactive), que des esters (acétate d'eugénol, acétate de benzyl et acétate de N-amyle) délivrés en phase vapeur pouvaient antagoniser, ou au contraire activer, certains ROs en présence de la CES1d, ce qui pointe bien l'impact du métabolisme enzymatique sur la modulation de l'activité des ROs (Kida et al., 2018). Chez l'Homme, la cétone 55 provoque une odeur boisée, fruitée et de framboise. Cette cétone serait métabolisée par les CYP2A13 pour former un métabolite nommé 56. Ce métabolite sent la framboise pure. L'ajout d'un compétiteur de CYP ((E)-3-(cyclopropyle méthylène octan-2-one) non odorant en présence de la cétone 55 enlève la perception de la note framboise, indiquant que le métabolite 56 n'a pas pu être synthétisé par les CYP2A13 (Schilling et al., 2010). Une technique a été récemment utilisée pour étudier l'impact du métabolisme enzymatique sur la qualité de l'odeur, la « cross-adaptation ». Cette technique a permis de montrer l'Homme que le 2-furfurylthiole (2FT) est métabolisé en sulfure de furfurylméthyle (FMS) dans le nez (les sujets étaient canulés dans le nez et les canules reliées à un PTR-MS). Le 2FT induit une odeur globale de café brûlé et le FMS une odeur d'ail piquante. Ces deux composants partagent des ROs en communs. Avec la technique de cross-adaptation, la présentation du métabolite FMS pendant 60 sec réduit significativement la qualité "ail piquant" du 2FT (par rapport à la présentation de l'eau pendant 60 sec). La présentation initiale du FMS sature le récepteur correspondant, qui n'est donc pas perçu dans un second temps suite au métabolisme du 2FT. L'odeur perçue du 2FT est donc un mélange du 2FT et de son métabolite, le FMS (Ijichi et al., 2019). Ces études montrent l'importance des EMXs olfactives dans la formation de métabolites à même de moduler le signal olfactif.

### *L'arrêt du signal olfactif*

Un rôle principal des EMXs est assurément de nettoyer l'environnement des récepteurs en molécules odorantes pour arrêter le signal afin d'éviter une trop longue stimulation ou une saturation des récepteurs. Une des premières études menée dans le domaine a montré que la

glucuroconjugaison, via les enzymes UGT, de molécules odorantes inactivent bien ces molécules puisque des enregistrements électrophysiologiques effectués au niveau des cellules mitrales du BO donnent des réponses plus faibles qu'avec les composés non-glucuroconjugués (Leclerc et al., 2002). De même, une autre étude a montré que les électro-olfactogrammes (EOGs) mesurés dans la MO de rats présentent des amplitudes plus faibles après la stimulation (2 stimulations discontinues de 2 min chacune) avec les métabolites hydroxylés (action des EMXs phase I) de molécules par rapport aux molécules initiales (quinoline, coumarine et acétate d'isoamyle), alors que les dérivés glucuroconjugués (action des EMXs phase II) des ces molécules n'induisent aucun signal EOG. L'application d'un inhibiteur de CYP ou de CES pendant 20 min conduit à augmenter les réponses EOG suite à une exposition à la quinoléine, la coumarine et l'isoamylacétate, illustrant une nouvelle fois le fait que les enzymes ont un rôle dans l'arrêt du signal. Logiquement, en revanche, après 2 min d'exposition avec l'inhibiteur, le signal olfactif commence à diminuer significativement. Une accumulation des odorants dans l'espace péri-récepteurs et une saturation des ROs pourraient être la cause de cette diminution (Thiebaud et al., 2013). Ces recherches suggèrent fortement que la biotransformation des molécules odorantes en molécules inactives par les EMXs de la phase II permet d'éviter la saturation des ROs. D'autres données obtenues par mes directeurs de thèse chez le lapin nouveau-né appuient l'importance des EMXs de la phase II dans l'inactivation et la perception finale des molécules odorantes à haute valeur biologique comme la phéromone mammaire. Une partie du chapitre D de l'introduction est consacrée à ce propos.

## *D. Notre modèle d'étude: le lapin nouveau-né et la phéromone mammaire*

### *1. Une phéromone cruciale pour le lapin nouveau-né*

Le lapin européen *Oryctolagus Cuniculus* présente un mode de relation mère-jeune inhabituel pour un mammifère, qui plus est nidicole, c'est-à-dire à gestation courte, construisant un nid et y délivrant un nombre généralement élevé de nouveau-nés. Contrairement aux autres femelles nidicoles, qui consacrent la majeure partie de leur temps d'activité quotidienne à s'occuper de leur progéniture, la lapine met bas dans un nid souterrain isolé qu'elle quitte quelques minutes seulement après la délivrance et le tout premier allaitement. Elle n'y retourne ensuite qu'une fois par jour, pour une durée 5 minutes environ entièrement consacrée à l'allaitement de sa portée (Zarrow et al., 1965). Pour cela, elle ouvre l'accès au terrier, allaite ses petits, puis une fois sortie referme soigneusement l'entrée du nid avec de la terre (Mykytowycz, 1968; Broekhuizen et al 1986). Ce comportement de visite unique au nid, par jour, qui pourrait être une réponse adaptative au niveau élevé de prédation auquel l'espèce est confrontée (Coureaud et al., 2010), est conservé chez la lapine domestique. Les éleveurs de lapins contrôlent même cet accès classiquement en élevage (par ouverture/fermeture de la trappe permettant l'accès à la boîte à nid), à la fois pour leur permettre de surveiller la tenue des allaitements, et également car un accès répété de la lapine dans le nid, si il intervient, occasionne des blessures et une augmentation de mortalité des nouveau-nés (Coureaud et al., 2000).

À la naissance, les lapereaux initialement aveugles et sourds présentent des aptitudes motrices limitées, mais très spécialisées. Ils répondent à des stimuli thermotactiles et olfactifs pour détecter l'entrée de la mère dans le nid et s'orienter efficacement vers son corps. Dès l'arrivée de celle-ci, ils expriment en effet un éveil comportemental marqué, et un comportement stéréotypé, dit de recherche de la mamelle, constitué par des mouvements céphaliques très rapides et de faibles amplitudes manifestés en parcourant la fourrure abdominale maternelle et conclus par la saisie orale d'une tétine (Hudson & Distel, 1986; Coureaud, 2000); ce comportement se répète toutes les 15-20 sec, les lapereaux ne restant pas fixés longtemps à une tétine mais en changeant régulièrement (Coureaud, 2000; Coureaud et al., 2002). Ce comportement est déclenché par deux catégories d'odeurs émises par le corps maternel: 1) des odeurs liées à son alimentation, perçues *in utero* par le fœtus et mémorisées jusqu'à la naissance (Coureaud et al., 2002), et 2) au-moins une odeur non apprise, contenue dans le lait de lapine parmi plus de 150 composés volatils

différents, et qui confère à ce dernier un haut pouvoir réactogène, le 2-méthyl-2-buténal (2M2B) (Figure 8A). Présenté expérimentalement hors nid à des lapereaux via une baguette de verre qui en a été imprégnée et qui est positionnée juste devant les narines - test dit d'activation orale -, le 2M2B engendre la réponse orocéphalique typique chez plus de 90% des lapereaux à qui cet odorant est présenté (Coureaud, 2000; Coureaud et al., 2007; Schaal et al., 2003) (Figure 8B). Le 2M2B a été qualifié de phéromone car il répond à l'ensemble des 5 critères de la définition rigoureuse du concept de phéromone proposée par Beauchamp et al. (1976), à savoir que (Coureaud, 2000 ; Schaal et al., 2003):

- 1) c'est un signal chimiquement simple (en l'occurrence monomoléculaire),
- 2) la molécule engendre une réponse de type on/off, stéréotypée intra- et inter-individus, et fonctionnelle (déclenchement de réponses d'éveil, attraction, et de recherche/saisie orale indispensable à la prise lactée),
- 3) son activité est sélective, en ce sens que seule cette molécule engendre le comportement en question dans des proportions aussi fortes,
- 4) son activité est exclusive à l'espèce *Oryctolagus Cuniculus* (nouveau-nés lièvres, rats, souris, chats, n'y répondent pas autrement que par du simple flairage),
- 5) son activité est indépendante de tout apprentissage. En effet, les lapereaux y répondent dès les premières secondes de vie néonatale, alors même que le 2M2B est absent du liquide amniotique et du sang de la lapine gestante, donc qu'il ne peut pas être appris par le fœtus lapin *in utero*. La réponse des lapereaux est donc prédisposée.

Par ailleurs, cette phéromone a été nommée la phéromone mammaire (PM) car elle semble sécrétée et libérée dans les mamelles elles-mêmes, le lait sous-mammaire n'étant pas du tout réactogène (Moncomble et al., 2005).

La réponse comportementale typique à la PM est concentration-dépendante, selon un profil de type courbe en cloche. Ainsi, diluée dans l'eau pure, sa gamme de perception par le nouveau-né se situe entre  $10^{-8}$  et  $10^{-5}$  g/ml, alors que son pouvoir réactogène diminue nettement jusqu'à devenir nul à des concentrations inférieures à  $2,5 \times 10^{-9}$  et supérieures à  $2,5 \times 10^{-4}$  g/ml (Coureaud et al., 2004). Son implication en tant que signal biologique paraît crucial pour la survie des lapereaux : le suivi en élevage du gain de poids et de la mortalité d'une population de lapereaux

entre J1 et J21, testés à J1 pour leur réponse/non réponse orale à la PM, a montré que les lapereaux qui ne répondaient pas à la PM à J1 (~ 9%) prenaient moins de lait ce même jour et présentaient un taux de mortalité entre J1-21 plus important (14,3%) que ceux y répondant (Coureaud et al., 2007) (Figure 8C). Sur le plan développemental, la réponse à la PM, très forte à la naissance, le demeure sur la période d'alimentation exclusivement lactée (J0-15), avant de décroître progressivement pour s'annuler au sevrage (J28); ce décours est visible aussi bien chez les lapins d'élevage que chez des lapins sauvages vivant en conditions semi-naturelles (enclos extérieur) (Coureaud et al., 2008) (Figure 8D). La diminution progressive de la réponse à la PM avec l'âge côté lapereaux (individus receveurs du signal) va de paire avec la diminution de l'émission de PM par les lapines dans son lait entre le début et la fin de la lactation (individus émetteurs) (Coureaud et al., 2006).

La PM joue donc un rôle essentiel dans le processus de tétée et le développement de l'interaction efficace du lapereau avec la mère au sein du nid. Il s'agit, encore à ce jour, de la seule phéromone connue pour exercer une telle action chez un mammifère (ce qui ne veut pas dire qu'il n'en existe pas d'équivalentes chez d'autres espèces, dont l'Homme). La PM ne perdrait pas nécessairement toute signification au-delà du sevrage: une étude a montré que son ajout sur l'aliment solide de lapins en conditions d'engraissement (J30-70) tendait à rendre celui-ci plus appétant et à diminuer la mortalité de ceux en consommant (Coureaud, 2000).

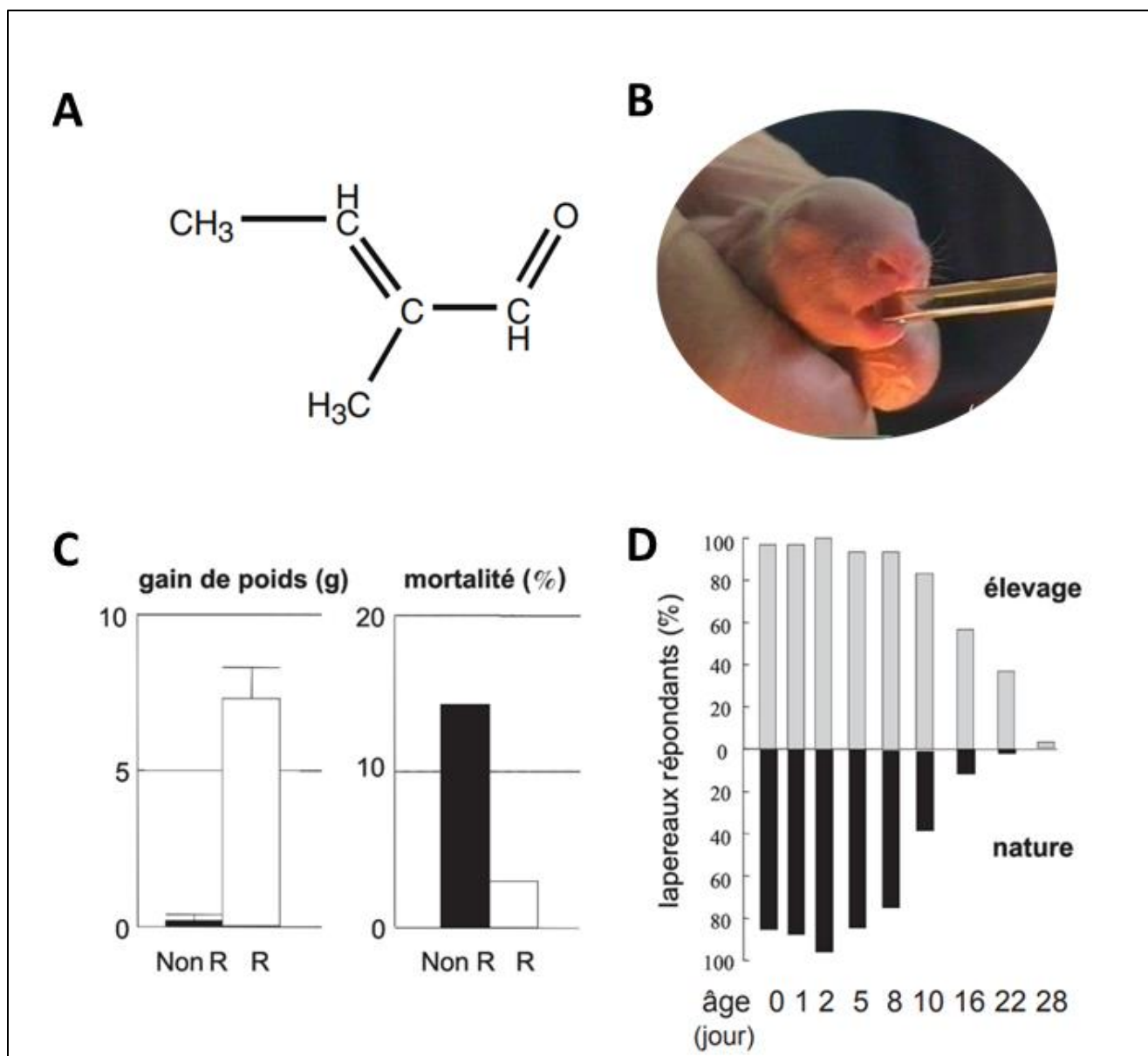


Figure 8: Formule chimique du 2-méthyl-2-buténal, la phéromone mammaire (PM) (A). Comportement de recherche et de saisie orale des lapins nouveau-nés face à une baguette en verre imprégnée de PM (B). Gain de poids (g) à J1 et mortalité (%) sur la période J1-7 de lapereaux non répondants (Non R) ou répondants (R) à la PM à J1 (C). Proportions de lapereaux répondant à la PM, à jeun, en conditions d'élevage et en conditions naturelles entre la naissance (J0) et le sevrage (J21 en nature, J28 en élevage) (D). (Figures tirées de Coureaud et al., 2008 et 2010).

## 2. Conjugaison de la phéromone mammaire par les glutathions transférases

La phéromone mammaire appartient à la famille des aldéhydes  $\alpha,\beta$ -insaturés (alkenal en anglais) contenant à la fois une double liaison carbone-carbone (C=C) et un groupe aldéhyde (-CHO) ce qui les rend particulièrement réactifs envers les molécules nucléophiles, telles que les

protéines et les enzymes. C'est une famille de produits chimiques issus de l'oxydation libre des acides gras endogènes ou de l'environnement. Certains de ces aldéhydes ont été identifiés comme des phéromones chez les insectes (Riddiford, 1967; Yamakawa et al., 2011). Les propriétés toxicologiques de ces aldéhydes ont été largement étudiées, notamment leur détoxification par les enzymes de type glutathion transférases, anciennement nommés glutathion S-transférases (GSTs) (Berhane et al., 1994). C'est pour ces raisons que nos équipes de recherche ont commencé à explorer le métabolisme de la PM par les GSTs en 2010 (Legendre et al., 2014, voir section 2.2). Dans la section suivante, une partie est consacrée à la description des GSTs en termes de structure, de localisation et de fonctions, suivie d'une partie pointant les données de nos équipes relatives à l'impact de la conjugaison enzymatique de la PM sur sa perception, socle de connaissances sur lequel nous nous sommes appuyés pour l'étude I de ma thèse.

### *2.1. Les glutathion transférases : structure, localisation et fonction*

Les GSTs constituent une superfamille d'enzymes métabolisant les xénobiotiques appartenant à la phase II, qui catalysent la conjugaison du tripeptide glutathion réduit ( $\gamma$ Glu-Cys-Gly) à des substrats électrophiles d'origine exogène ou endogène (Hayes et al., 2005). Les GSTs sont réparties en 3 grands groupes selon les propriétés chimiques : 1- les GSTs microsomaux appartenant à la famille des MAPEG (Membrane Associated Proteins in Eicosanoids and Glutathione metabolism), 2- les GSTs Kappa, des protéines solubles et identifiées dans les mitochondries et les peroxysomes et 3- les GSTs cytosoliques, des protéines solubles se trouvant dans le cytoplasme (Pemble et al., 1996; Jakobsson et al., 1999). Ce dernier groupe de GSTs est le groupe le plus large. Il est constitué de différentes classes désignées par des lettres grecques, telles que Alpha, Delta, Epsilon, etc., abrégées en majuscules romaines A, D, E, etc. Les isoformes de chaque classe sont distingués par des chiffres arabes. La dénomination des isoformes varie selon la séquence en acides aminés et les propriétés enzymatiques, structurales et fonctionnelles de la protéine. Le nombre d'isoformes retrouvés peut atteindre 80 chez certaines espèces de plantes (Liu et al., 2013). Les classes Alpha, Mu, Omega, Pi, Sigma, Theta et Zeta ont été identifiées chez les mammifères, incluant plusieurs isoenzymes au sein de chaque classe. Chez les lapins, la classe Alpha comprend 10 isoenzymes, 7 pour la classe Mu, 2 pour Omega, 5 pour Theta, 1 pour Zeta et 1 pour Pi (Tan & Low, 2018). Actuellement, le terme GSTs canonique ou simplement GSTs est

employé pour désigner les GSTs cytosoliques à cause de la présence de certains isoformes dans le noyau, les mitochondries mais aussi dans les peroxysomes.

La structure des GSTs est le plus souvent en dimères, présentant deux sous-unités qui peuvent être identiques (homodimères) ou différentes (hétérodimères) (Figure 9B). Dans certains cas, une structure trimérique peut être trouvée (Fyfe et al., 2012). La masse moléculaire d'un monomère est d'environ 25 KDa, soit environ 250 à 300 acides aminés. Le domaine N-terminal des GSTs contient un motif thiorédoxine conservé, constitué d'un arrangement de quatre brins  $\beta$  et de trois hélices  $\alpha$  permettant la liaison du glutathion (appelé site G). Le domaine C-terminal contient un domaine hélicoïdal dont le nombre varie selon la classe ou l'isoforme permettant la liaison de nombreux substrats de nature variées (appelé site H) (Figure 9A). Par exemple, les classes Pi et Mu possèdent cinq hélices  $\alpha$  dans ce domaine, (Reinemer et al., 1991) et la classe Alpha en possèdent six (Sinning et al., 1993).

Le principal rôle des GSTs est de prendre en charge les molécules activées (ou non) par les enzymes de phase I, en les conjuguant avec une molécule de glutathion (la glutathionylation), afin d'augmenter leur solubilité et faciliter leur excrétion par les transporteurs enzymatiques de phase III. Au cours d'une glutathionylation transitoire par les GSTs, les substrats peuvent subir une isomérisation. Par exemple, la GSTA1 pourrait catalyser l'isomérisation de stéroïdes intermédiaires dans la synthèse des hormones sexuelles (Dourado et al., 2014). La GSTP1 et la GSTM seraient également impliquées dans l'isomérisation de l'acide rétinoïque 13-cis et 9-cis en acide rétinoïque all-trans, la forme active de la vitamine A (Chen & Juchau, 1998). Outre leur fonction catalytique, les GSTs peuvent avoir des fonctions de transport et/ou stockage, dites "ligandin" (en anglais), ce qui est le cas de la GSTA et GSTM pour le transport de la bilirubine, l'hème et les stéroïdes (Litwack et al., 1971; Ketterer et al., 1983). Ils sont également impliqués dans plusieurs autres fonctions importantes telles que la signalisation cellulaire, les modifications post-traductionnelles et la résistance aux médicaments chimiothérapeutiques, en particulier les GSTP1 (Mazari et al., 2023). On observe une surexpression de cette dernière dans de nombreuses cellules cancéreuses (Hirata et al., 1992; Nelson et al., 2001). Il a été démontré que la GSTP1 se lie sur la partie C-terminale des kinases Jun-terminales (JNK), membres de la famille des protéines kinases activées par les mitogènes (MAPK). Le complexe GSTP1-JNK empêche ainsi la JNK



d'interagir sur la suite de la cascade de signalisation régulant l'apoptose et la prolifération cellulaire (Wang et al., 2001).

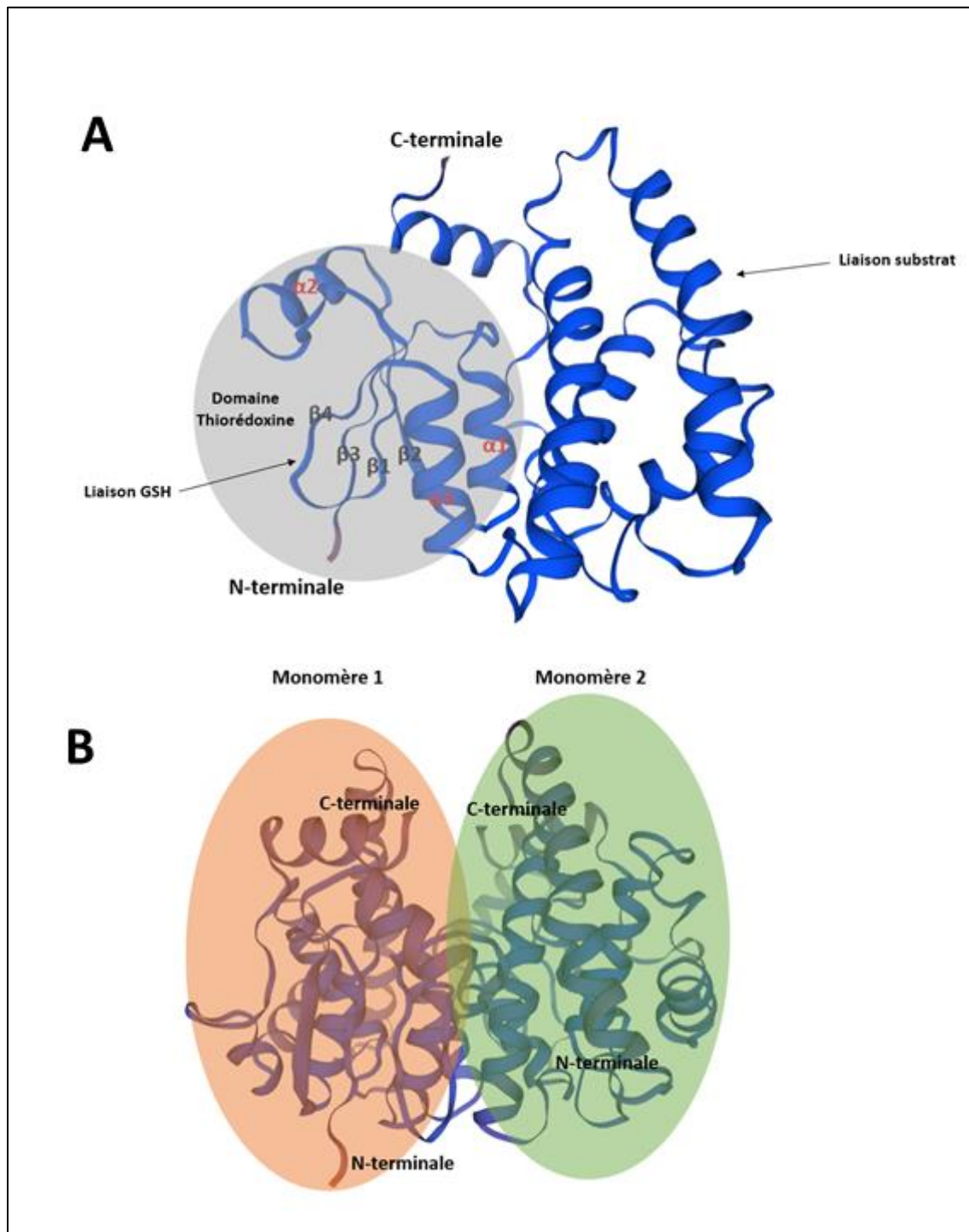


Figure 9: Structure du monomère (A) et du dimère (B) de la GSTA1 de lapin (Q08863). Obtenue depuis Uniprot (<https://www.uniprot.org/uniprotkb/Q08863/entry>)

Les études protéomiques ont montré la présence de GSTA1 (P08263) et de P1 (P09211) dans le mucus nasal (MN) d'humains adultes (Débat et al., 2007) et de la GSTM1 (P04905), M2 (P08010) et P1 (P04906) dans le MN de rats adultes (Heydel et al., 2019). Chez le lapin nouveau-né, la GSTA1 (Q08863), M1(P46409) et P1 (G1U9R0) ont été retrouvés dans le MN. Ceci a été confirmé par la formation d'un conjugué PM-glutathion en présence du MN de lapereaux (Robert-Hazotte et al., 2019). Dans le tissu olfactif de rat adultes ou en pré- et postnatal, les classes de GSTA et GSTM ont été localisées au niveau des cils olfactifs, la partie supra-nucléaire des cellules sustentaculaires, les cellules basales et les glandes de Bowman (Krishna et al., 1994; Heydel et al., 2019). GSTM montre une expression zonale beaucoup plus marquée au niveau de la partie latérale des cornets olfactifs (Whitby-Logan et al., 2004). Aucune donnée sur la localisation cellulaire des GSTs n'avait été obtenue chez le lapin/ lapereau jusqu'à ma thèse.

## *2.2. L'inhibition des glutathion transférases favorise la détection de la phéromone mammaire*

En utilisant la technique de chromatographie sur couche mince, mes encadrants ont montré pour la première fois la formation d'un conjugué PM-glutathion en présence de PM et d'homogénats de tissus olfactifs de lapins nouveau-nés (Legendre et al., 2014). Sachant qu'une conjugaison chimique peut, sur le principe, avoir lieu sans l'intermédiaire des GSTs dans des conditions *in vitro*, le rapport de conjugaison enzymatique/chimique a été évalué dans cette étude, indiquant une valeur de 2,36. Ce rapport était de 4,13 pour un autre aldéhyde, le cinnémaldéhyde. La conjugaison de la PM a été validée par une seconde étude explorant la disparition de la PM dans l'espace de tête d'une enceinte contenant le tissu olfactif de lapin nouveau-né et la PM en temps réel (PTR-MS) et la formation du conjugué PM-glutathion (CAD-HPLC) (Robert-Hazotte et al., 2019). La formule chimique proposant la conjugaison de la PM avec le glutathion est présentée ci-dessous (Figure 10):

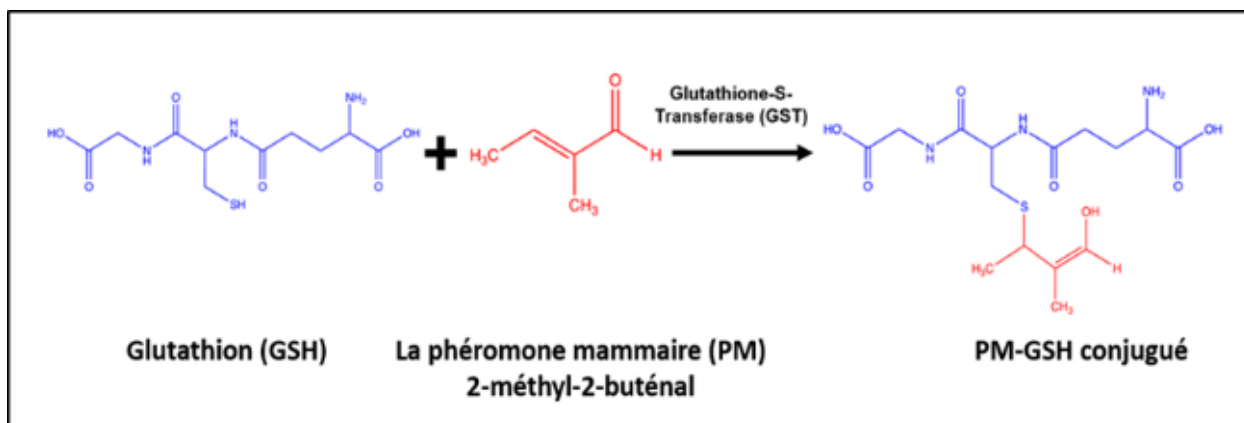


Figure 10: Formation du conjugué phéromone mammaire-glutathion suite à l'action des glutathion transférases.

Il a été suggéré que la conjugaison PM-glutathion catalysée par les GSTs soit impliquée dans l'arrêt du signal, la PM une fois conjuguée étant supposée ne plus être capable de stimuler ses ROs. Pour étudier cela, il était intéressant d'essayer d'inhiber l'activité des GSTs *in vivo* puis d'observer l'effet sur la perception de la PM. Potentiellement, une telle inhibition pouvait conduire à ne plus métaboliser la PM et, donc, à modifier sa perception. La première stratégie suivie a été d'utiliser des compétiteurs de la PM au niveau des GSTs. Il a été montré que deux composés pouvaient entrer en compétition avec la PM sur le site catalytique de l'enzyme GST (Figure 11.A) : le 2-méthyl-2-penténal (2M2P) et le 3-méthyl-2-buténal (3M2B), deux composés ayant une formule chimique proche de celle de la PM avec un rapport de conjugaison enzymatique/chimique respectivement de 1.93 et de 0.97 (Legendre et al., 2014). Les résultats ont montré que l'ajout du 2M2P ou du 3M2B avec la PM (ratio 3:1 compétiteur/PM) en présence de MO de lapins nouveaux, réduit la formation du conjugué PM-glutathion et ralentit la disparition de la PM respectivement *ex vivo* et *in vitro* (Hanser et al., 2017). Au niveau comportemental, la PM proposé à une concentration très faible de  $10^{-9}$  g/ml est indétectable et non-réactogène pour les lapereaux. En revanche, le mélange du 2M2P ou du 3M2B à  $10^{-6}$  g/ml avec la PM à la concentration  $10^{-9}$  g/ml induit une augmentation significative de la réponse des lapereaux à la PM avec une réponse maximale au mélange 2M2P+PM (Fig. 11B) (Hanser et al., 2017). Dans une autre étude, la stratégie a été de diminuer le métabolisme glutathion dépendant de la PM en lavant le nez des lapereaux *in vivo* contenant les enzymes GSTs, dont la présence en quantité avait été montrée dans le mucus (Robert-Hazotte et al., 2019). Ainsi, le lavage du MN a conduit au même effet que dans l'étude avec les compétiteurs, c'est-à-dire l'observation d'une réactivité très forte des lapereaux à

la PM à la concentration  $10^{-9}$  g/ml, alors que celle-ci est normalement non réactogène (Robert-Hazotte et al., 2019).

Ces données montrent bien que l'inhibition du métabolisme enzymatique de la PM, par l'ajout d'un compétiteur métabolique ou le lavage du mucus nasal, conduit à son accumulation instantanée au niveau de l'espace péri-récepteurs permettant ainsi une activation d'un plus grand nombre de ROs par la PM et, donc, la réponse comportementale des lapereaux malgré une concentration initiale non réactogène. Le métabolisme participe donc bien à l'arrêt du signal puisque celui-ci est plus fort quand le métabolisme s'arrête. Selon l'hypothèse, l'action des GSTs à la naissance serait d'inactiver le plus vite possible la PM pour ne pas saturer les ROs, permettant ainsi une perception quasi-continue de ce stimulus vital durant le temps très court de présence de la femelle au nid et d'allaitement chez cette espèce (5 min/jour) (pour information, un lapereau nouveau-né manquant une tétée est en danger, un lapereau en manquant deux d'affilée est mort; Coureaud et al., 2000). Ceci suit la même logique que dans les études que nous avons décrites dans la partie C.5 qui pointaient un rôle majeur des EMXs de phase II dans la dégradation des molécules odorantes pour l'inactivation de signaux olfactifs chez les rats.

Pour définitivement attester de cette inactivation, la production et la purification du conjugué PM-glutathion est en cours d'élaboration dans un autre projet complémentaire (contrat CRNL interne entre équipes ENES et FLUID du CRNL, stage de M2 de Julie Boiteux) pour *in fine* être testé au niveau électrophysiologique et comportemental chez les lapereaux.

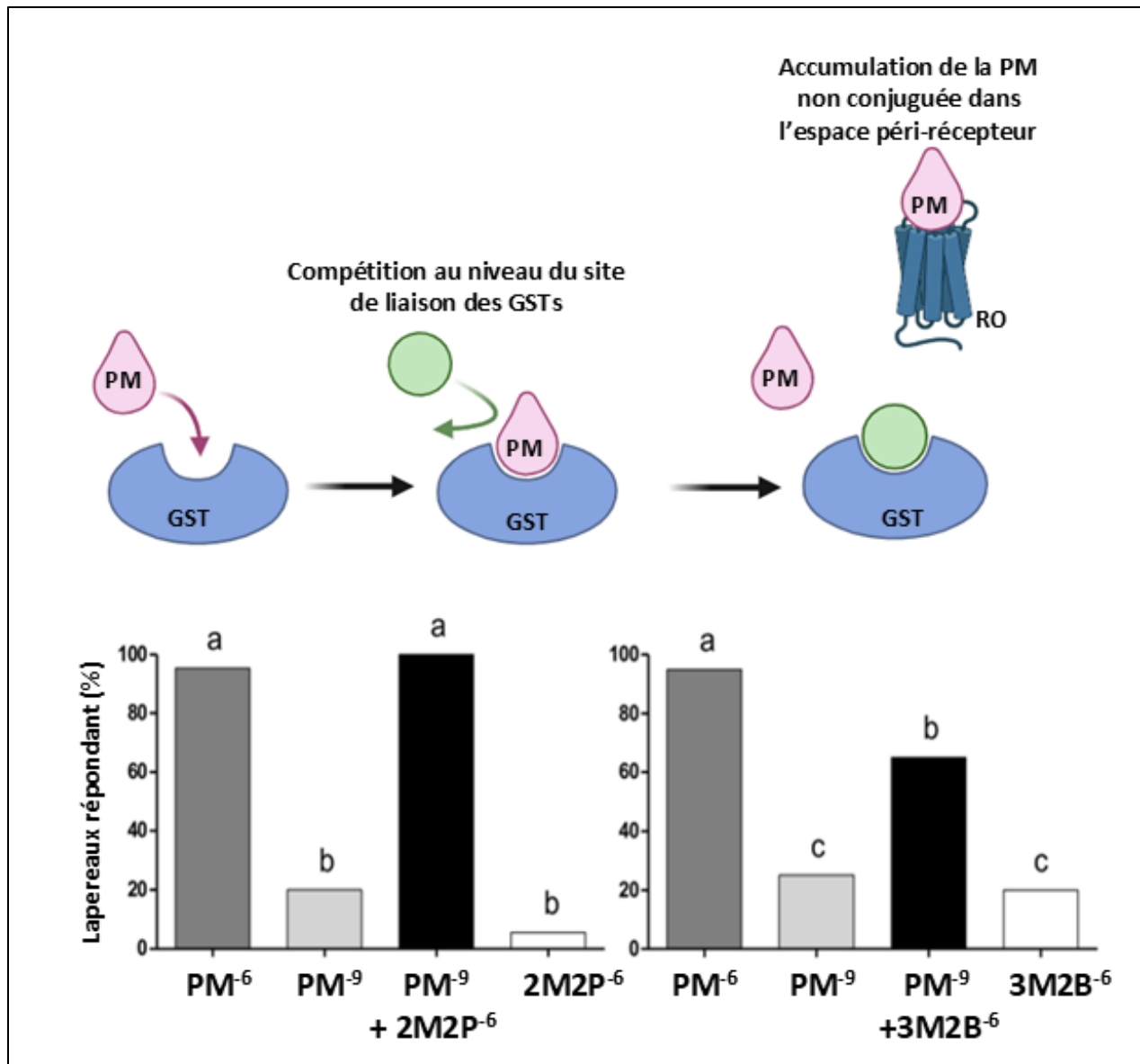


Figure 11: Compétition avec le 2M2P ou le 3M2B de la conjugaison de la PM au glutathion par les GSTs, conduisant à une augmentation des molécules de PM disponibles dans l'environnement péri-récepteur (A), et impliquant une meilleure détection à des concentrations très faible de la PM ( $10^{-9}$  g/ml), habituellement non réactogène (B) (Hanser et al., 2017).

### 3. L'apprentissage olfactif phéromone-induit

Si la PM est un remarquable signal déclencheur d'un comportement vital chez le lapereau dès les premiers instants de sa vie néonatale, son action ne s'arrête pas là. En effet, sa valeur biologique positive et appétante en fait un spectaculaire stimulus inconditionnel, actif en tant que récompense dans le cadre d'apprentissage olfactif de type associatif (conditionnement pavlovien). Ainsi, toute molécule odorante (ou mélanges d'odorants) initialement neutre

comportementalement et présentée brièvement à des lapereaux en présence de PM (1 exposition, 5 min), devient 24h plus tard autant réactogène que la PM elle-même, c'est-à-dire déclencheuse de la réponse orocéphalique typique du comportement de tétée (e.g., Coureaud et al., 2006, 2009, 2014, 2022; Jouhanneau et al., 2016; Schneider et al. 2016). La procédure de conditionnement olfactif médié par la PM, ainsi que certaines de ses caractéristiques, sont décrites ci-dessous. Cette section est suivie d'une présentation de données récentes obtenues par notre équipe lyonnaise sur la sensibilité olfactive des lapereaux à un odorant, post-conditionnement à cet odorant, données sur lesquelles s'est fondée l'étude II de ma thèse.

### *3.1. Conditionnement olfactif PM-induit*

L'apprentissage médié par la PM est un apprentissage appétitif particulièrement efficace chez les lapereaux à jeun depuis 24h (Coureaud et al., 2006; Montigny et al., 2006). La procédure consiste à isoler 4-5 lapereaux dans une bassine en dehors du nid, à les transférer dans une salle d'expérimentation, et à présenter juste au-dessus de la portée un gant en coton imbibé de quelques millilitres du mélange odeur nouvelle+ PM (Figure 12). Bien que 15 secondes d'exposition à ce mélange suffisent à induire l'apprentissage de l'odeur nouvelle, la procédure utilisée en routine dure 5 minutes, ce qui permet de mimer le temps d'exposition naturelle à la PM dans le nid lorsque la femelle vient les allaiter. Pour un apprentissage optimal, la PM doit être présentée à  $10^{-5}$  g/ml (Figure 13A) (Coureaud et al., 2006). La concentration de l'odeur conditionnée peut, elle, varier jusqu'à son seuil de détection (Duchamp-Viret et al., 2021).

L'apprentissage induit par la PM est aussi efficace en termes de réactivité des lapereaux au stimulus conditionné, 24h après exposition au mélange odeur+PM, que l'apprentissage engendré par l'ajout du même stimulus conditionné au niveau de l'abdomen de la lapine juste avant qu'elle n'allait, apprentissage dit « tétée-induit » par comparaison à l'apprentissage « PM-induit » (Figure 13B) (Coureaud et al., 2006; Jouhanneau et al., 2016). Ainsi, la PM jouerait un rôle majeur en conditions écologiques d'allaitement des lapereaux par leur mère, non seulement en tant que déclencheur du comportement néonatal permettant la localisation efficace des tétines, mais aussi en tant que promoteur d'apprentissage d'odeurs véhiculées par le corps maternel (Coureaud et al., 2010). L'apprentissage PM-induit est actif sur une période restreinte du développement, illustrant l'existence d'une période sensible: hautement fonctionnel de J0 à J3, son activité diminue à J4 et devient nulle à compter de J5 (alors que dans le même temps la PM demeure déclencheuse du

comportement de recherche de la mamelle) (Coureaud et al., 2010). Dans mes travaux de thèse portant sur l'apprentissage, nous nous sommes pour cela volontairement limités à la période J0-J4.

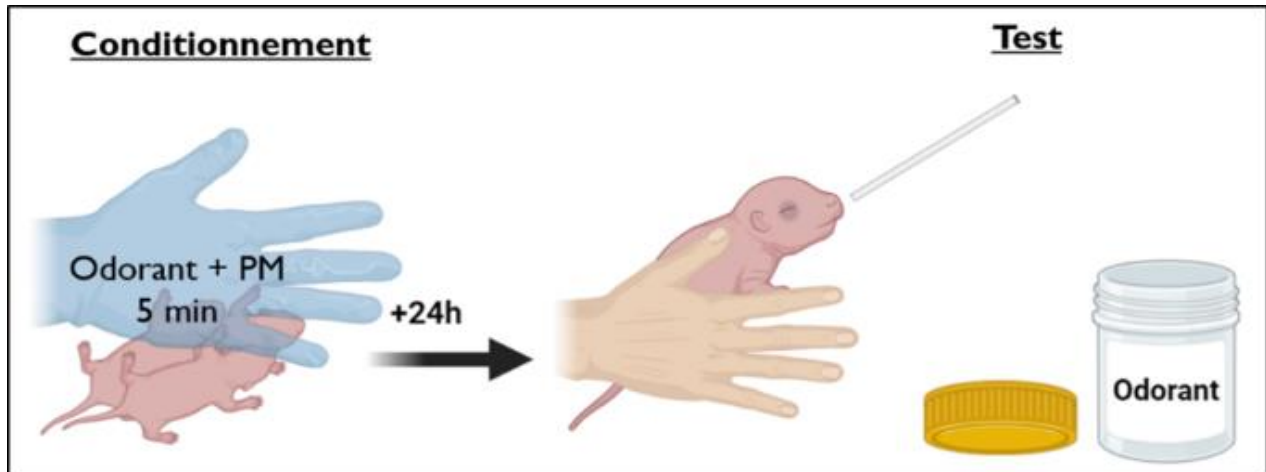


Figure 12: Procédure d'apprentissage d'une odeur nouvelle par association à la PM (phase de conditionnement suivie d'une phase de test 24h après) (dessin original de M.S. Hjeij réalisé avec Biorender).

Afin d'évaluer l'efficacité de l'apprentissage PM-induit d'un odorant et la rétention de l'information apprise, le test classiquement utilisé est celui dit d'activation orale, c'est-à-dire le même que celui utilisé pour évaluer l'activité de la PM : l'odorant conditionné est présenté, seul (sans PM), via une baguette de verre devant les narines de lapereaux maintenus individuellement dans la main gantée d'un expérimentateur, et le comportement orocéphalique des nouveau-nés est observé durant 10 secondes (Figure 12). La réponse est considérée positive lorsque les lapereaux expriment le comportement typique de recherche et/ou saisie orale, habituellement généré par la PM, et négative s'il n'y a aucune réponse si ce n'est du flairage. Après conditionnement unique à un odorant, une proportion optimale de lapereaux répondants s'observe 24h après, l'apprentissage PM-induit nécessitant une phase de consolidation mnésique (Coureaud et al., 2009) (Figure 12) ; à titre de comparaison, au-delà de 48h, et en absence de réexposition à l'odorant conditionné, la mémoire semble s'estomper, signe d'une forme apparente d'oubli de l'information acquise (Figure 13C) (Coureaud et al., 2006). Une reconsolidation mnésique est requise pour que la mémoire perdure si, 24h après le conditionnement initial, le stimulus conditionné est rappelé (Coureaud et al., 2009). Par ailleurs, étant devenu réactogène, le stimulus conditionné devient à son tour renforçant et générateur de

l'apprentissage d'un deuxième stimulus conditionné, par couplage direct stimulus conditionné 2 + stimulus conditionné 1 (apprentissage dit de second ordre) (Coureaud et al., 2011).

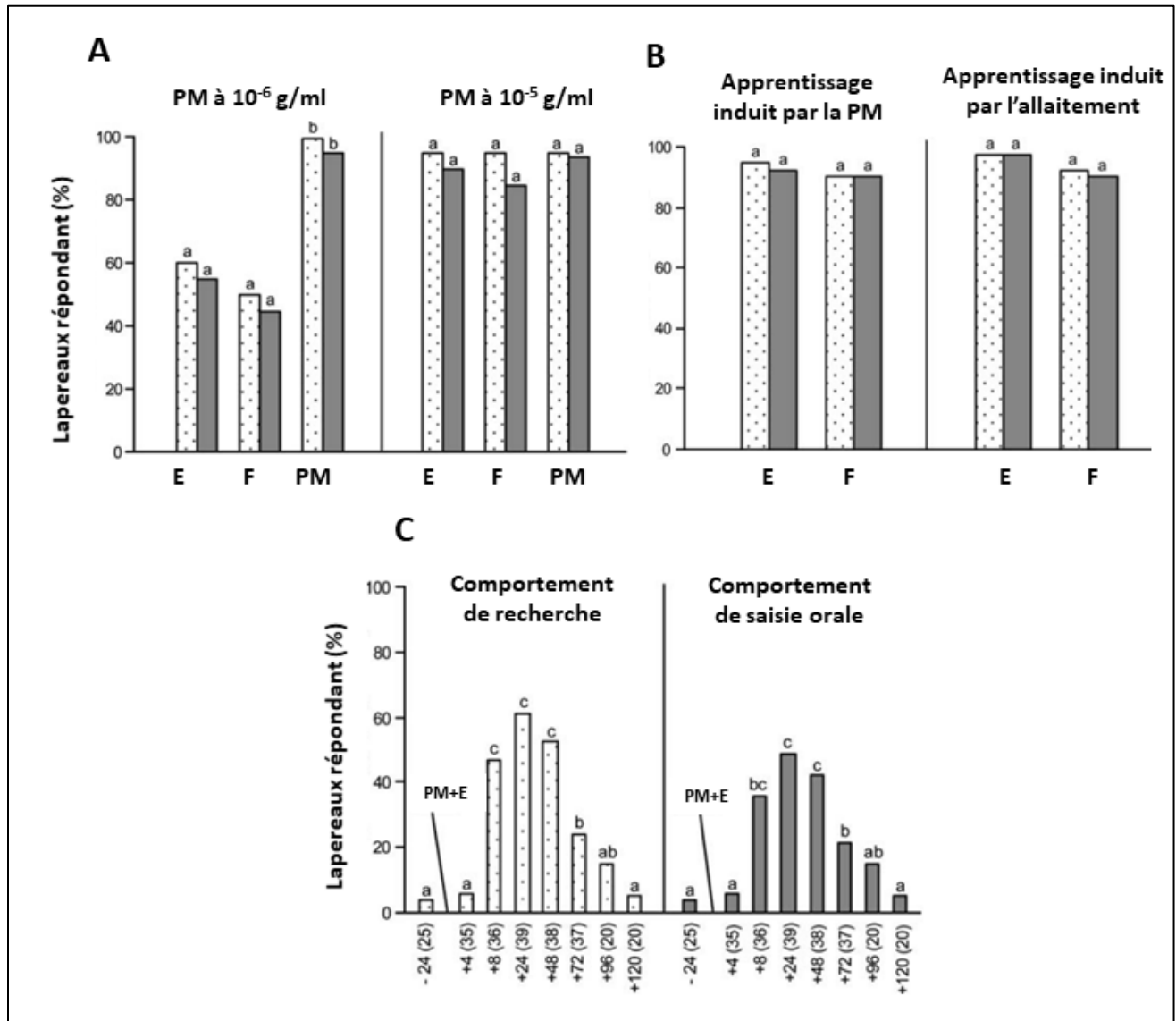


Figure 13: Proportions de lapereaux répondant par le comportement de recherche (barres blanches) et de saisie orale de la baguette en verre (barres grise) à l'odorant E (acétoacétate d'éthyle) et F (furanéol) lorsqu'ils ont été appris par association avec la PM à la concentration  $10^{-6}$  et  $10^{-5}$  g/ml ainsi que leur réponse à la PM à ces deux concentrations (A), à l'odorant E et F lorsqu'ils ont été PM-appris ou après application sur l'abdomen de la lapine (B) et à l'odorant E selon le temps (en heure) auquel le test a été effectué après l'association (n de lapins testés) (C) (Coureaud et al., 2006).



### 3.2. Sensibilité olfactive engendrée par apprentissage PM-induit

Récemment, la sensibilité olfactive des lapins nouveau-nés a commencé à être étudiée avant versus après apprentissage, donc chez des animaux respectivement naïfs versus conditionnés (Duchamp-Viret al., 2021). L'odorant utilisé dans cette étude en tant que stimulus conditionné était l'éthyl maltol, une molécule connue pour être un des deux odorants (odorant B) d'un mélange binaire (AB) induisant chez le lapereau la perception partiellement synthétique du mélange (e.g., Coureaud et al., 2008, 2009, 2014, 2020 ; ce même mélange est perçu également de façon synthétique par d'autres espèces mammaliennes - rongeurs : Wilson et al., 2020; Homme : Le Berre et al. 2008, Barkat et al. 2012 – mais aussi par des invertébrées - abeilles : Wycke et al., 2020 - ) (review dans Coureaud et al., 2022) (ce mélange est présenté en section B3 de l'introduction générale).

La sensibilité olfactive a été étudiée par mesure de l'évolution du seuil de détection de l'odorant B entre seuil spontané chez les lapins naïfs et seuil post-apprentissage de l'odorant B (24h après association à la PM). Comme les lapereaux ne répondent pas spontanément à B par le comportement orocéphalique typique, la détermination du seuil exact de détection spontané chez les animaux naïfs n'est pas possible. Il a de fait été estimé en recherchant la plus basse concentration à laquelle l'odorant B pouvait être apprise. Par la suite, des groupes de lapins naïfs ont été conditionnés à des concentrations décroissantes de B, puis testés à B à la concentration  $10^{-5}$  g/ml (Figure 14A). Le groupe dit "conditionné", lui, a été conditionné à B à la concentration  $10^{-5}$  g/ml avant d'être testés à B à plusieurs concentrations décroissantes de l'odorant (Figure 14B).

Pour les lapereaux conditionnés à des concentrations décroissantes de B, il est apparu qu'à partir de la concentration  $10^{-17}$  g/ml, l'odorant B n'était plus apprenable par couplage à la PM puisque à partir de cette concentration les nouveau-nés ne répondaient plus à B  $10^{-5}$  g/ml post-conditionnement. Ainsi, le seuil de détection spontané de B semblait se situer entre  $10^{-15}$  et  $10^{-17}$  g/ml. Par contre, la réponse des lapins conditionnés à B  $10^{-5}$  g/ml ne s'éteignait qu'à partir de la concentration  $10^{-19}$  g/ml, pointant donc l'existence d'un seuil de détection post-apprentissage pour cet odorant se situant entre  $10^{-17}$  et  $10^{-19}$  g/ml. Une diminution du seuil de détection de B d'un pas de 100 s'observait donc entre avant et après conditionnement, soulignant une augmentation de la sensibilité olfactive des lapereaux. En parallèle, des enregistrements électrophysiologiques (EOG)

effectués sur les cornets olfactifs de lapereaux naïfs versus conditionnés a montré que l'amplitude de ces EOG augmentait en réponse à la présentation de l'odorant B chez les lapereaux conditionnés. Dans leur ensemble, les résultats de cette étude témoignaient de l'installation d'une plasticité périphérique allant de paire avec le conditionnement PM-induit, et ce même après un seul et bref épisode de conditionnement. Cette plasticité, et l'augmentation de la sensibilité allant avec, reflétait l'existence du phénomène dit d' « induction », initialement proposé chez l'Homme par Wysocki et collaborateurs (Wysocki et al., 1989), et démontré ici pour la première fois chez un nouveau-né. Les données sur les seuils de détection indiquaient une sensibilité accrue de ce petit animal se rapprochant des seuils les plus bas décrits dans la littérature chez les vertébrés à ce jour (Tabuchi et al., 2013). Cela nous a incité à creuser ce phénomène et l'étude de la sensibilité néonatale des lapereaux après apprentissage (étude II de ma thèse).

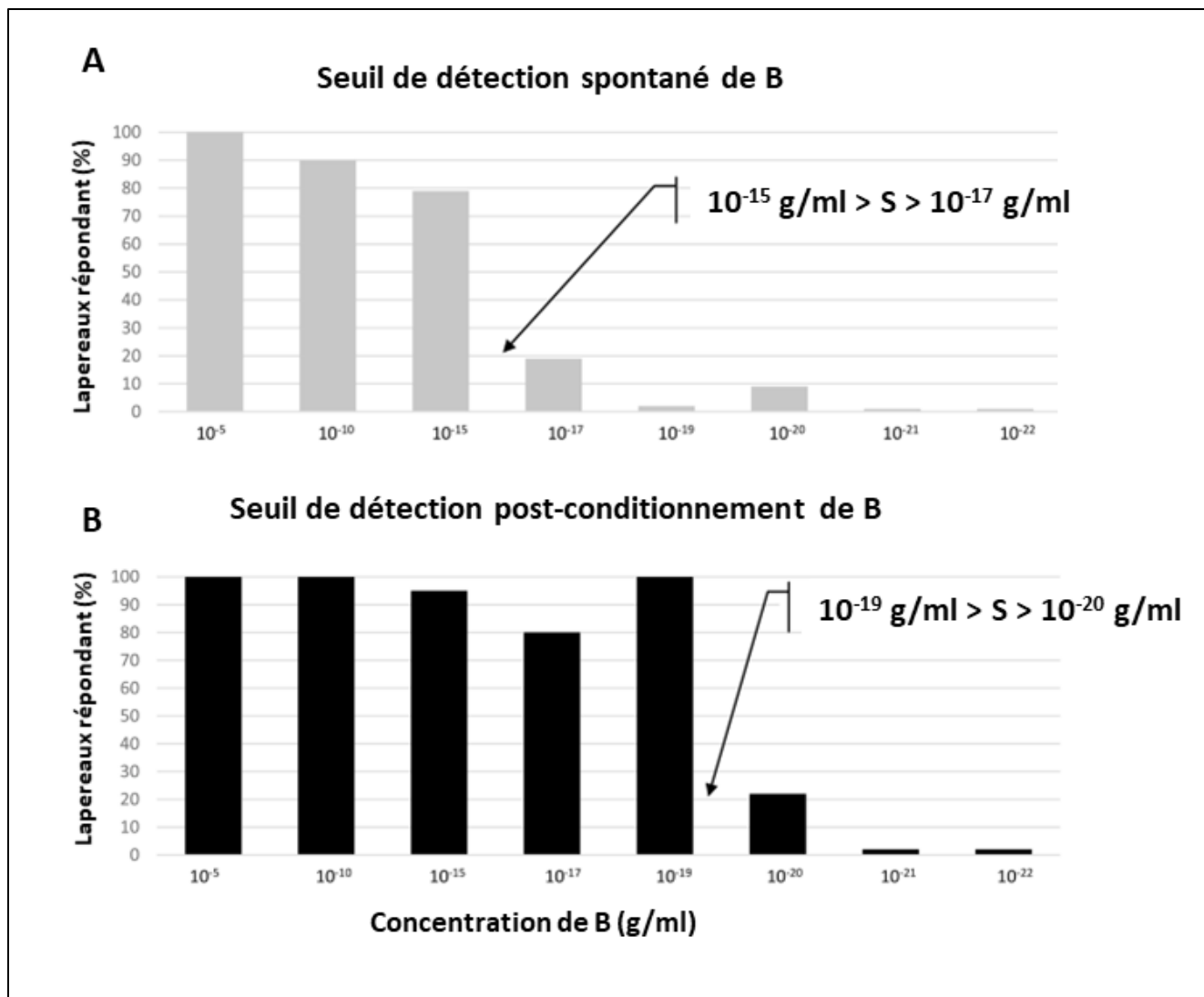


Figure 14: Proportions de lapins nouveau-nés répondant à l'odorant B à  $10^{-5}$  g/ml, en fonction de la concentration de B utilisée lors du conditionnement (détermination du seuil de détection spontané) (A). Proportions de lapins nouveau-nés répondant à l'odorant B à des concentrations variées après le conditionnement à B  $10^{-5}$  g/ml (détermination du seuil de détection post-conditionnement) (B) (Figure tirée de Duchamp-Viret et al., 2021).

---

## OBJECTIFS

---

Le lapin et la PM constituent un modèle de choix pour explorer les mécanismes biologiques sous-tendant le comportement olfacto-guidé du nouveau-né dans sa recherche cruciale de lait au contact du corps de la mère. Ils ont par ailleurs fait (et continuent à faire) l'objet de plusieurs travaux d'intérêt sur la mémoire olfactive précoce. Par exemple par couplage entre pharmacologie et éthologie, il a été montré que l'apprentissage PM-induit impliquait les processus de consolidation et reconsolidation, classiquement décrit jusqu'alors surtout chez les mammifères adultes (Coureaud al., 2009, 2011) ainsi que d'apprentissages de haut niveau renforcé (2<sup>nd</sup> ordre) ou implicite (préconditionnement sensoriel) (Coureaud et al., 2011, 2022). Le lapereau et l'apprentissage PM-induit ont également été utilisés à de multiples reprises pour étudier la perception analytique versus synthétique des mélanges d'odorants, et ce de façon originale car appliquée à la période néonatale (e.g., Coureaud et al., 2008, 2009, 2014, 2020; Sinding et al., 2011, 2013; Romagny et al., 2014, 2015; Schneider et al. 2016). Récemment, le modèle nous a permis de révéler que le métabolisme enzymatique de la PM par des glutathions transférases (GSTs) impactaient la perception de la phéromone, et que sa détection était favorisée quand les GSTs étaient inhibées (Hanser et al., 2017; Robert-Hazotte et al., 2019). Dans ce contexte, **l'étude I de mon projet de thèse a cherché à caractériser les 3 classes essentielles de GSTs (GSTA, GSTM et GSTP1) en termes d'expression, régulation, localisation et de variation au cours du développement, afin de mieux comprendre leur intérêt respectif dans le métabolisme et la perception de la PM.**

Comme énoncé ci-dessus, les lapereaux avaient par ailleurs montré une sensibilité olfactive accrue à un odorant suite à l'apprentissage PM-induit de cet odorant, pointant une plasticité cognitive et sensorielle traductrice d'un processus d'induction fonctionnel dès l'étage du système périphérique (Duchamp-Viret et al., 2021). Dans cette étude, une seule molécule, avait été utilisée, l'éthyl maltol. **Dans l'étude II de mon travail de thèse, nous avons prolongé cette étude en examinant jusqu'à quelle concentration les lapereaux parvenaient à apprendre cet odorant B (de  $10^{-2}$  à  $10^{-22}$  g/ml), et si la gamme de concentrations actives sur le comportement variait en fonction de la concentration d'apprentissage. Par ailleurs, dans un souci de généralisation,**

**nous avons comparé les résultats obtenus jusqu'alors avec cet odorant, avec un autre odorant, de volatilité plus importante, l'isobutyrate d'éthyle (odorant A du mélange AB).**

Enfin, une dernière étude a été entamée afin de lier partie I de la thèse sur les EMXs et partie II sur les seuils de détection des odeurs apprises. **Dans l'étude III, nous avons cherché à vérifier si la modulation enzymatique des EMXs pouvait affecter le seuil de détection d'odorants appris. En particulier, nous avons testé un odorant appris, le 2-méthyl-2-penténal (2M2P), en présence ou absence d'un compétiteur odorant pour les mêmes EMXs. Cela nous permet de lier directement la régulation enzymatique explorée dans l'étude I avec les variations de seuils de détection étudiées dans l'étude II, et d'évaluer comment l'activité des EMXs peut moduler la perception olfactive dans un contexte d'apprentissage.**

---

## *Etude I*

---

### *Caractérisation moléculaire et cellulaire des glutathion transférases impliquées dans le métabolisme de la phéromone mammaire*

#### *1. Introduction*

Pour qu'une molécule olfactive soit perçue et éventuellement reconnue par un mammifère, elle doit d'abord traverser les voies nasales périphériques et stimuler les NSO, qui relaient l'information vers les voies centrales. À la périphérie, les enzymes métabolisantes de phase II (EMX), appelées acteurs périrécepteurs, interviennent avant l'activation des NSO en métabolisant les odorants, modulant ainsi le signal olfactif. La plupart des enzymes étudiées sont des enzymes de phase I, telles que le CYP450, les CES, les dicarbonyl-xylulose réductases et les ALDH (Heydel et al., 2019 ; Robert-Hazotte et al., 2022 ; Boichot et al., 2023). Cependant, les enzymes de phase II ont été initialement considérées comme les plus actives, car leur activité met fin au signal olfactif (Lazard et al., 1991; Leclerc et al., 2002; Neiers et al., 2021).

Dans notre étude, nous avons cherché à caractériser les GSTs, la famille spécifique d'EMX de phase II jouant un rôle clé dans le métabolisme de la PM chez les lapins nouveau-nés. Nous avons d'abord étudié l'activité enzymatique des principales classes de GSTs (GSTA1, M1 et P1) envers la PM *in vitro* en utilisant des protéines recombinantes. Ensuite, nous avons identifié leur expression et leur régulation *in vivo* dans le MN et le tissu olfactif à travers diverses techniques protéomiques, histologiques et moléculaires chez des lapins nouveau-nés et, comparativement, de jeunes lapins sevrés (non répondant à la PM à cet âge par le comportement typique de recherche-saisie des mamelles).

Cette étude apporte de nouvelles connaissances sur les mécanismes enzymatiques contrôlant la disponibilité nasale des odeurs, soulignant l'importance du métabolisme olfactif dans la perception des odeurs essentielles à la survie de l'espèce à cet âge, et a fait l'objet d'un article soumis dans la revue JAFC (Hjeij M.S. et al).

## 2. Matériels et méthodes

### 2.1. Expériences in vitro

#### 2.1.1. Production et purification des GSTs

Les séquences d'ADN codant pour les protéines de GSTA1 (numéro d'accès UniProt Q08863), GSTM1 (numéro d'accès UniProt P46409) et GSTP1 (numéro d'accès UniProt G1U9R0) de lapins *Oryctolagus cuniculus* ont été soumises à une optimisation des codons pour expression dans *Escherichia coli*. Les séquences des protéines sont les suivantes :

**Séquence de GSTA1 :** MARKPLLHYF NGRGRMESIR WLLAAAGEEF DEKFMETAED  
LDKLRNDGSL MYQQVPMVEI DGMKLVQTRA ILNYVANKHN LYGKDMKERA  
LIDMYTEGVA DLYELVLLLP LCPPEQKDAK VDFIKEKIRT RYFPAFEKVL  
KSHGQDYLVG NRLSKADILL VELLYNVEEL DPSAIASFPL LKALKTRISS  
LPTVKKFLQP GSQRKPPMDE KNLEKAKKIF KIP

**Séquence de GSTM1 :** MPMTLGYWDV RGLALPIRML LEYTDTSYEE KKYTMGDAPN  
YDQSKWLSEK FTLGLDFPNL PYLIDGTHKL TQSNAILRYL ARKHGLCGET  
EEERIRVDIL ENQLMDNRFQ LVNVCYSPDF EKLKPEYLKG LPEKLQLYSQ  
FLGSLPWFAG DKITFADFLV YDVLDQNRIF VPGCLDAFPN LKDFHVRFEG  
LPKISAYMKS SRFIRVPVFL KKATWTGI

**Séquence de GSTP1 :** MPPYTIVYFP VQGRCEAMRM LLTDQGQSWK EEVVNLETWS  
QGSLKASCLY GQLPKLQDGD LTLYQSNAIL RHLGRTLGIY GKDQREAALL  
DMVNDGVEDL RIKYITLIYT NYDAGKDSYV KALPGHLKPF ETLISQNKDG  
KSFIVGDQIS FADYNLLDLL LTHQILAPGC LDAFPLLSAY VARLSARPKL  
KAFLASPEHV NRPINANGKK

Les séquences d'ADN synthétisées ont été produites par Genewiz (Leipzig, Allemagne) puis sous-clonées et insérées dans le vecteur pET22b (Novagen, Darmstadt, Allemagne) via les sites de restriction NdeI et SacI. Les plasmides résultants ont été transformés dans la souche BL21 star d' *E. coli* (Novagen, Darmstadt, Allemagne). Les colonies ont été isolées à partir d'une plaque d'agar LB contenant de l'ampicilline (100 µg/mL). Les cellules transformées ont été cultivées à 37°C dans 10 ml de milieu LB, puis cultivées pendant la nuit à 37°C. Cette culture préliminaire a servi à inoculer 1 litre de milieu LB-Amp. Lorsque la culture cellulaire a atteint une densité optique (DO)

de 0,6 à 600 nm, l'expression de la protéine recombinante a été induite par l'ajout de 1 mM d'isopropyl  $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG), et les cellules ont été cultivées pendant 4h supplémentaires à 37°C. La croissance bactérienne a été arrêtée par centrifugation (vitesse de rotation de la centrifuge à 4000 x g pendant 30 min), et les bactéries ont été suspendues dans un tampon Tris contenant 50 mM de saccharose à 250 mM, pH 8,0. Les bactéries ont ensuite été centrifugées une seconde fois à 4000 x g pendant 30 min, et les culots cellulaires stockés à -20°C. Les cellules ont été suspendues dans un tampon de liaison (10 mM phosphate de sodium et 150 mM NaCl, pH 7,0) et soumises à une sonication (Vibracell ; Bioblock, Pittsburgh, PA, USA) à 4°C pour disruption. Après centrifugation à 24000 x g pendant 45 min à 4°C, GSTA1, GSTM1 et GSTP1 ont été purifiés à partir du surnageant chargé sur une colonne GSTrap HP de 5 mL (Cytiva, Marlborough, MA) connectée à un système ÄKTA Pure (Cytiva, Marlborough, MA). La colonne a été lavée avec cinq volumes de colonne du même tampon de liaison, pH 7,0, et les GST ont été élués via un tampon de phosphate de sodium à 10 mM et 150 mM de NaCl, pH 7,0, enrichi en 10 mM de GSH réduit. La pureté des fractions a été évaluée par SDS-PAGE. La concentration en protéines a été estimée via les coefficients d'extinction molaire de 18,91 M<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup> (GSTA1), 40,01 M<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup> (GSTM1) et 27,52 M<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup> (GSTP1), calculés à partir des séquences d'acides aminés avec le serveur ExPASy ProtParam.

### *2.1.2. Préparation pour l'analyse LC-MS*

Les protéines ont été incubées avec 1 mM de dithiothréitol (pour réduire le résidu de cystéine libre présent dans la protéine) pendant 20 min à température ambiante, puis dialysées deux fois à 4°C contre un tampon de phosphate de potassium à 50 mM, pH 7,0. Les GST ont finalement été concentrées à 2,5 mg/mL (où la concentration en protéines était de 100  $\mu$ M) via une colonne de centrifugation Amicon Ultra avec une coupure de poids moléculaire de 10 kDa (Millipore, Billerica, MA, USA) et stockées à -20°C.

### *2.1.3. Métabolisme in vitro de la phéromone mammaire par les GST*

La mesure de la conjugaison enzymatique avec le GSH a été réalisée comme précédemment décrit. En résumé, les incubations enzymatiques ont été effectuées dans un mélange réactionnel de 50  $\mu$ L en PBS contenant GSTA1, GSTM1 ou GSTP1 (100  $\mu$ M), GSH (15 mM) et 30 mM de phéromone mammaire (PM ; 2-méthyl-2-buténal, CAS# 497-03-0, Sigma–Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) ou 300 mM de cinnamaldéhyde (CAS# 104-55-2, Sigma–Aldrich). La réaction



a été arrêtée en ajoutant 50 µL d'une solution de CuSO<sub>4</sub> (25 %) après 80 min d'incubation à 37°C. Les produits de réaction ont ensuite été analysés par chromatographie liquide à haute performance (HPLC) couplée à un détecteur d'aérosol chargé Corona Ultra RS (CAD ; Thermo Scientific Thermo Electron, Waltham, MA, USA). L'analyse a été réalisée via un gradient multistep, et le volume d'injection était de 10 µL de PM et 5 µL de cinnamaldéhyde. Le traitement des données a été effectué avec le logiciel Chromeleon 7.2. Le signal a été mesuré en pA/min (picoampères par unité de temps). Pour déterminer la conjugaison enzymatique de GSH des odorants, la quantification HPLC des conjugués d'odorants a été systématiquement réalisée en présence (conjugaison enzymatique) et en absence (conjugaison chimique) des GST recombinantes. La conjugaison enzymatique avec le GSH a été définie en soustrayant la conjugaison chimique dans trois expériences indépendantes pour le test avec la PM et dans une seule expérience pour le test avec le cinnamaldéhyde.

## 2.2. *Expériences in vivo*

### 2.2.1. *Animaux*

Les lapins européens (*Oryctolagus cuniculus*) de race Néo-Zélandaise, mâles et femelles (Charles River, L'Arbresle, France) étaient hébergés au Centre de Zootechnie de l'Université de Bourgogne en cages individuelles sous un cycle lumière-obscurité constant de 12:12 (lumière allumée à 7h00), avec une température ambiante maintenue à 21-22 °C, et de l'eau et aliment (Lapin Elevage 110, Safe, France) fournis *ad libitum*. Deux jours avant la mise-bas, un nid (0,39 x 0,25 x 0,32 m) était ajouté à l'extérieur des cages des femelles. Afin d'égaliser l'expérience d'allaitement entre les lapereaux, toutes les femelles avaient accès à leur nid entre 11h30 et 13h, assurant ainsi à la femelle le temps d'allaiter sa portée une fois par jour comme habituellement chez cette espèce (Zarrow et al., 1965; Coureaud et al., 2000 ; Coureaud et al. 2006). Un total de 50 nouveau-nés de 2 à 3 jours et 13 lapins juste sevrés de 30 à 31 jours ont été utilisés dans cette étude, dans le respect des règles éthiques en vigueur en France. Le projet a été approuvé par le Comité d'Éthique de l'Université de Bourgogne et le Ministère de l'Éducation Nationale, de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche (MNESR) (n° d'autorisation : 001273.01).

### 2.2.2. Collecte de mucus nasal

Le MN a été collecté dans le cadre d'une étude précédente décrite dans l'article de Robert-Hazzote et al. (2019). Brièvement, les animaux ont été décapités et la mâchoire inférieure a été disséquée pour limiter les mouvements de déglutition. 20 µl de DPBS 1× stérile et filtré à pH=7 ont été introduits dans chaque narine pour augmenter le volume de mucus. Le MN a ensuite été soigneusement aspiré à travers un tube capillaire stérile (0,9 mm de diamètre, 130 cm de longueur) à l'aide d'une pompe à seringue automatique inversée réglée à 1 ml/min. Le MN de 12 lapins nouveau-nés a été mélangé et réparti dans 3 tubes différents. De même, les MN de 12 lapins sevrés a été également mélangé et réparti dans 3 autres tubes.

### 2.2.3. Analyse protéomique du mucus nasal

Après la collecte, les six tubes de MN de lapins nouveau-nés et sevrés ont été centrifugés à 20 000 g pendant 20 min à 4°C. Les surnageants ont ensuite été digérés avec 200 ng de trypsine pendant la nuit. Les peptides ont été fractionnés sur une colonne commerciale en phase inversée C18 (75 µm × 250 mm, particules de 2 µm, colonne PepMap100 RSLC, Thermo Fisher Scientific) et analysés par des instruments Q-Exactive MSMS (Thermo Fisher Scientific). Les données de spectrométrie de masse MS/MS ont été interprétées en utilisant le moteur de recherche Mascot (version 2.4.0, Matrix Science, Londres, Royaume-Uni). Les mesures expérimentales peuvent être tolérées avec une variance de 0,2 Da par rapport aux valeurs théoriques lors de l'identification des peptides, en utilisant une base de données composite contenant des séquences cibles et des leurres pour minimiser les faux positifs. Cette base de données inclut des séquences de protéines de notre modèle d'étude (lapin européen, *Oryctolagus cuniculus*) issues de la base de données UniProt, ainsi que des séquences de trypsine recombinante et de contaminants classiques. Lors de l'analyse, certaines modifications post-traductionnelles des protéines ont été recherchées comme variables, notamment la carbamidométhylation de la cystéine, l'oxydation de la méthionine, l'acétylation N-terminale des protéines et la propionamidation de la cystéine. Une coupure manquée par la trypsine a été autorisée, au maximum. Pour chaque échantillon, seuls les peptides répondant aux critères suivants ont été retenus : présence d'un ou plusieurs peptides de plus de 9 résidus, score ionique supérieur à 20, score d'identité supérieur à 6, ceci afin de garantir un taux de faux positifs de 1 %.

Un total de 485 protéines, sur les 919 d'origine, ont été sélectionnées pour cette étude afin de garantir la rétention de données pertinentes (>1 peptide/lapin). Chaque protéine a été caractérisée

à l'aide de la base de données UniProt, puis classée dans l'un des 16 groupes fonctionnels suivants, en fonction de son rôle le plus probable dans le tissu nasal : Structuration, Métabolisme général, Immunité, Protéase, Inhibiteur de protéine, Chaperonne, Oxydoréduction, Enzymes métabolisant les xénobiotiques (EMX), Transport ou Liaison, Protéine de liaison des odorants (OBP), Protéines membranaires, Protéines des fluides, Signalisation cellulaire, Machinerie moléculaire, Élimination ou Recyclage, et Antioxydant. De plus, un groupe "Non caractérisé" a été désigné pour les protéines inconnues ou non identifiées selon la base de données UniProt. L'analyse porte sur du descriptif et la moyenne des peptides pour chaque EMX a été comparée entre les lapins nouveau-nés et sevrés.

#### *2.2.4. Exposition à la phéromone mammaire pendant 45 minutes*

Des lapins nouveau-nés de 2 à 3 jours, à jeun, ont été placés dans une boîte en polystyrène (40 x 30 x 30 cm) contenant des copeaux de bois (similaires à ceux mis dans les boîtes à nids des lapines), avec une boule à thé suspendue au-dessus de leur tête pendant 45 min (des tests ont été réalisés aussi à 5 et 15 min d'exposition en annexe 4). La boule à thé contenait un papier filtre (1 x 1 cm) imbibé de 100 µL de la PM diluée dans de l'eau, soit à  $10^{-2}$  g/mL (concentration forte, non active sur le comportement orocéphalique), soit à  $10^{-5}$  g/mL (concentration réactogène). Les lapins témoins étaient exposés à des papiers filtre imbibés de 100 mL d'eau.

#### *2.2.5. Collecte des tissus*

Les lapereaux de 2-3 jours, exposés ou non à la PM, et ceux de 30-31 jours non exposés ont été sacrifiés par décapitation. La collecte et le stockage des tissus ont été effectués selon les méthodes décrites ci-dessous. Le temps entre la dissection et l'analyse a été maintenu aussi court que possible pour réduire la perte d'activité métabolique.

#### *2.2.6. Immunohistochimie*

Les têtes ont été disséquées et immédiatement fixées avec une solution de formaldéhyde (4 % tamponnée, pH 6,9) pendant 48h à température ambiante. Après décalcification avec de l'acide éthylène diamine tétraacétique disodique à 10% dans un tampon saline phosphate (pH 7,4) pendant quatre semaines avec des changements réguliers, les échantillons ont été déshydratés et inclus dans de la paraffine. Des sections de 5 micromètres d'épaisseur ont été déparaffinées, réhydratées et colorées immunohistochimiquement. Une étape de prétraitement antigénique a été réalisée via la

technique de démasquage antigénique à haute température avec récupération des cibles dans un tampon citrate, pH 6,0, pendant 45 min. Pour les expériences visibles, les peroxydases endogènes ont été traitées avec un réactif de blocage pendant 10 min à température ambiante avant équilibrage dans un tampon Tris-HCl à 0,05 M, 0,15 M NaCl et 0,05 % Tween 20, pH 7,6. Les sections tissulaires ont été saturées pendant 45 min avec 10% de sérum de chèvre normal (G9023, Merck, Darmstadt, Germany) dans un diluant d'anticorps (S0809, Agilent) pour réduire la liaison non spécifique pour GSTP1 (et l'OMP en annexe 2) et avec 10% de sérum d'âne (D9663, Merck, Darmstadt, Germany) pour la coloration de GSTA1.

Pour la coloration expérimentale visible, les sections ont été incubées avec un anticorps primaire de souris anti-GSTP1 (CF801775 ; OriGene Technologies, Rockville, USA) à une dilution se situant entre 1 :6 000 et 1 :10 000 selon l'échantillon dans le mélange d'anticorps (et avec l'anticorps primaire de souris anti-OMP (sc-365818, Santa Cruz Biotechnologie, Dallas, USA) à la dilution de 1:300 en annexe 2). Les sections tissulaires ont ensuite été incubées avec un anticorps secondaire de chèvre anti-souris HRP (P0447; Agilent) à une dilution de 1:200 dans le mélange d'anticorps pendant 1h à température ambiante. Pour la coloration de GSTA1, les sections ont été incubées avec un anticorps de chèvre primaire anti-GSTA1 (ab53940, Abcam, Cambridge, UK) à une dilution se situant entre 1:1 000 et sur 1 :3 000 selon l'échantillon, puis avec un anticorps secondaire d'âne anti-chèvre HRP (ab6885, Abcam) à une dilution de 1:200 dans le mélange d'anticorps pendant 1h à température ambiante. La coloration immunohistochimique a été réalisée via un système chromogène liquide DAB+ (K3468, Agilent). Les sections ont été contre-colorées avec une solution d'hémalum de Mayer. Les lamelles ont été montées dans un milieu aqueux.

Pour les expériences de fluorescence GSTP1, les sections tissulaires ont été incubées avec l'anticorps primaire anti-GSTP1 à une dilution de 1:4 000, puis avec l'anticorps secondaire chèvre anti-mouse Alexa568 (A11019, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) à une dilution de 1:200 dans le diluant d'anticorps pendant 90 min à température ambiante. Les lamelles ont été traitées avec un milieu antifading contenant DAPI (P36962, Thermo Fisher Scientific). Dans tous les cas, un contrôle négatif a été préparé en remplaçant l'anticorps primaire par le diluant d'anticorps seul. Les lames colorées visibles et fluorescentes ont été examinées avec un microscope Eclipse E600. Les images ont été acquises avec une caméra numérique DS-Ri2 via le logiciel NIS-Elements Basic Research (Nikon, Tokyo, Japan).

### 2.2.7. Western blot

Les hémi-muqueuses olfactives ont été soigneusement diss qu es pour éviter toute contamination avec l'épithélium respiratoire, immédiatement congel es avec de l'azote liquide, puis stock es   -80 C jusqu'à extraction. Une hémi-muqueuse de chaque lapin a été broy e dans 200  L d'une solution de Tris-HCl à 50 mM, pH 7,5, 250 mM de saccharose et 1 mM d'EDTA par deux cycles de lyse tissulaire de 60 sec chacun. Les échantillons ont ensuite été centrifugés pendant 10 min à 10 000 x g   4 C. Les surnageants ont été collectés et ultracentrifug s à 105 000 x g   4 C pendant 60 min. Ensuite, les surnageants, contenant la partie soluble, ont été collectés et stockés à -80 C. Les niveaux de protéines ont été quantifiés par la méthode de Lowry en utilisant l'albumine sérique bovine (BSA) comme standard. La migration a été effectu e en utilisant 10  g de protéine et 0,5  g de protéine recombinante dans un gel SDS-PAGE préfabriqué   4-15 % (4561086 , Biorad) avec un tampon Tris-glycine-SDS   200 V pendant 45 min. Le marqueur de poids moléculaire était le Precision Plus Protein™ Dual Xtra (1610377, Biorad). Les protéines ont ensuite été transf r es sur une membrane en nitrocellulose avec un équipement de transfert trans-blot. Les membranes ont été satur es pendant 1h avec agitation à température ambiante dans une solution contenant 0.02 M Tris, 0.15 M NaCl, 0.1% (v/v) Tween 20 au pH 7.6 (TBST) et 5% (p/v) de lait en poudre ou 3% (p/v) de BSA. Après 5 lavages avec TBST, les membranes satur es avec du lait ont été incub es avec un anticorps de souris anti-GSTP1 (CF801775, OriGene Technologies, Rockville, USA) ou un anticorps de souris anti-tubuline pour la protéine contrôle (22833, Thermo Fisher Scientific) dilués à 1:4 000 et 1:2 000 dans du TBST, et celles satur es avec du BSA ont été incub es avec un anticorps de chèvre anti-GSTA1 (ab53940, Abcam) dilué à 1:4 000 dans du TBST avec 1% de BSA pendant la nuit à 4 C. Le lendemain, les membranes ont été lav es 5 fois avec du TBST, puis incub es pendant 1h à température ambiante avec agitation en présence d'anticorps secondaires. L'anticorps secondaire d' ne anti-chèvre HRP (ab6885, Abcam) a été dilué dans du TBST, et 1% (p/v) de BSA, tandis que l'anticorps secondaire de chèvre anti-souris Alexa568 (A11019, Thermo Fisher Scientific) a été dilué uniquement dans du TBST, tous deux à 1:10 000. Les membranes marqu es au GSTP1 ont été à nouveau lav es 5 fois avec du TBST, incub es toute la nuit à 4 C avec agitation avec l'anticorps anti-tubuline de souris à 1:2 000, lav es le lendemain 5 fois avec du TBST et incub es pendant 1h à température ambiante avec agitation avec l'anticorps secondaire de chèvre anti-souris à 1:10 000. Enfin, après 5 lavages avec du TBST, les membranes ont été impr gn es de 500  l du réactif luminol et de 500  l de réactif

oxydant du kit Western Lightning™ Plus (NEL104001EA, Revvity, Waltham, USA), puis visualisées avec un système d'acquisition ChemiDoc™ (Bio-Rad, Californie, USA). Selon les anticorps utilisés, les images ont été acquises toutes les 0,3 à 4 sec jusqu'à saturation. La dernière image acquise avant saturation a été analysée via le logiciel Image Lab™ 6.0.1 (Bio-Rad) en divisant les valeurs moyennes des bandes de GSTP1 ou GSTA1 par les valeurs moyennes des bandes de la protéine de référence tubuline. Le test t bilatéral de Student a été utilisé. Les différences statistiques ont été comparées entre les groupes, et les astérisques indiquent une signification statistique (\*\*P < 0,01 et \*\*\*P<0,001).

#### 2.2.8. RT-qPCR

La deuxième moitié de l'hémi-muqueuse utilisée pour le western blot a été homogénéisée dans 1 ml de TRIzol via deux cycles de lyse tissulaire de 60 sec chacun. Deux cents microlitres de chloroforme ont été ajoutés à l'homogénat, et le mélange a ensuite été centrifugé à 12 000 × g pendant 15 min à 4 °C. Les surnageants contenant l'ARN ont été transférés dans un autre tube, incubés avec 500 µl d'isopropanol pendant 10 min à température ambiante, puis centrifugés à 12 000 × g pendant 10 min à 4 °C. Les surnageants ont été retirés, et les pellets ont été lavés avec 500 µl d'éthanol à 75 % et centrifugés à 7 500 × g pendant 5 min à 4 °C. L'éthanol a été complètement retiré, et les pellets ont été resuspendus dans 90 µl d'eau ARN-free. L'ARN a été quantifié par spectrophotométrie (spectromètre UV/Vis, lecteur de microplaques SPECTROstar de BMG LABTECH (Hesse, Allemagne)) puis stocké à -80 °C. La qualité de l'ARN a été analysée via un Agilent TapeStation 4200.

Un microgramme d'ARN a été digéré avec 1 µl de DNase, 1 µl de tampon MgCl<sub>2</sub> et de l'eau sans ARN d'un kit Thermo Fisher (EN0525, Thermo Fisher Scientific) pendant 30 min à 37°C. Un microgramme d'EDTA a ensuite été ajouté pour arrêter la réaction, suivi d'une incubation pendant 10 min à 65°C. La transcription inverse a été réalisée via le iScript™ Reverse Transcription Supermix (1708890, Bio-Rad). Cinq cents nanogrammes d'ARN digéré avec de l'ADN ont été mélangés avec le réactif iScript contenant l'enzyme de transcription inverse, 4 µl de tampon et de l'eau, suivis d'un passage au thermocycleur pendant 5 min à 25°C (amorçage), 20 min à 42°C (transcription inverse) et 1 min à 96°C (inactivation).

La qPCR a été réalisée dans une plaque de 96 puits, chaque puits contenant 5 µg de cDNA dilué au 1/5, 10 µl d'iTaq™ Universal SYBR® Green Supermix (1725120, Bio-Rad), 2,5 µl

d'amorce sens et 2,5 µl d'amorce antisens diluées au 1/50. Le programme de qPCR était organisé en 2 étapes : une phase de maintien de 20 sec à 95°C et une étape de cycle alternant 40 fois entre 3 sec à 95°C et 30 sec à 60°C. Le programme de qPCR s'est terminé par une courbe de fusion (StepOne™ Real-Time PCR System, Thermo Fisher Scientific). Pour chaque condition, 5 échantillons ont été considérés, et chaque échantillon a été dupliqué techniquement. GAPDH et Actine ont été identifiés comme gènes de ménage après étude de la stabilité de leur expression. Les efficacités des amorces ont été calculées préalablement en utilisant du cDNA dilué 1/10. Une valeur proche de 2 a été considérée comme optimale pour l'efficacité de la qPCR. La liste des amorces utilisées avec leur efficacité se trouve dans le Tableau 1. Des contrôles négatifs sans cDNA ont été déposés sur la même plaque. Les calculs ont été effectués via la formule ddCT et analysés via un test t bilatéral de Student (\*\*P < 0,01 et \*\*\*P < 0,001).

Tableau 1: Amorces utilisées pour l'analyse RT-qPCR ainsi que leur efficacité.

Gènes	N° d'accès	Sens	Antisens	Efficacité
GSTA1	NM_001171097.1	TGAAGAGCCACGGACAAG	GGAGGCTGCTGATTCTGGTT	1,98
GSTM1	XM_008264729.2	ACCTTCGCCGATTTCTTGT	CCACTTGGCTGTCTTTGCAC	1,93
GSTP1	XM_002724272.3	CGCCCTACACCATCGTCTAC	CAGGATGGCATTGGACTGGT	1,94
ALDH1A1	AY508694.1	ACCAAATTGCTGAGCCTGTC	ATTTCTTGCCGCTCACTGAA	2,1
CYP4502G1	NM_001195764.1	GCTCAGTCCTCAAAGACCCC	AGGCAGATGCGTTTTCCAGA	2,09
AOX2	NM_001297488.1	ACCCGATTCTCCTCTCTGCT	GTCTGGGTTTTCTCCTCCGG	2,16
AKR1B10	NM_001267588.1	TATCTCATCCACTGGCCACA	GTACGGGTGACACTCGACCT	2
AKR1B1	NM_001082287.1	GTGCCACCCGTACCTAACTC	CGTCACGGACTTGGGAATCA	1,94
Actine	AF000313	GGATGTCCACGTTCGCACTTC	TCCTTCCTGGGCATGGAGTC	2
GAPDH	NM_001082253	AGGGCTGCTTTTAACTCTGG	ATGACCAGCTTCCCCTTCT	1,94

#### 2.2.9. Comarquage en fluorescence de l'hybridation in situ et de l'immunohistochimie

Préparation des tissus : Des héli-muqueuses olfactives de lapins nouveau-nés et sevrés ont été soigneusement disséquées, immédiatement immergées dans du TissueTek à -20 °C, puis stockées à -80 °C dans les conditions le plus stériles possibles. Des coupes de sept micromètres d'épaisseur ont été réalisées au cryostat et stockées à -80 °C.

Préparation des sondes : les régions codantes de GSTA1 (numéro d'accès UniProt : Q08863) et GSTP1 (numéro d'accès UniProt : G1U9R0) ont été amplifiées à partir de l'ARN du tissu olfactif

de lapins nouveau-nés, clonées et insérées dans le vecteur pGEM-T Easy (A1360, Promega, Pékin, Chine) pour la transcription *in vitro*. Les plasmides ont été linéarisés avec SpeI (Promega, Pékin, Chine) et Sac II (Fermentas, Thermo Fisher Scientific) pour GSTA1, et avec SpeI (Promega) et NcoI (JenaBiosciences, Jena, Allemagne) pour GSTP1. Des sondes d'ARN marquées à la digoxigénine (DIG) ont été créées via le kit de marquage ARN DIG SP6/T7 (11175025910, Roche, Bâle, Suisse). Les amorces utilisées pour générer les sondes étaient les suivantes : GSTA1 : CCGCTGCTGGAGAAGAGTTT (amorce gauche), GGGTCGAGCTCTTCCACATT (amorce droite) ; et GSTP1 : CCAGTCCAATGCCATCCTG (amorce gauche), GGTCCCACAAACCCTCACTT (amorce droite).

Toutes les solutions ont été soigneusement préparées la veille des expériences dans un environnement sans ARN. Les expériences se sont étalées sur 4 jours avec les 3 premiers jours consacrés à l'hybridation *in situ* et le dernier jour pour l'immunohistochimie.

Jour 1 : Les lames ont été laissées à sécher à température ambiante pendant 10 min, puis fixées avec du formaldéhyde à 4 % dans du PBS tamponné au phosphate pendant 15 min à 4°C. Ensuite, les lames ont été lavées avec du PBS pendant 5 min, incubées dans du HCl 0,2 M pendant 10 min, puis lavées à nouveau avec du PBS pendant 5 min. Les lames ont été incubées pendant 30 min dans l'obscurité à température ambiante avec du H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> à 0,1 %/PBS 1×, puis lavées deux fois pendant 5 min avec du PBS (la deuxième fois à 55 °C). La phase de préhybridation consistait à incuber les lames pendant 1h dans une chambre humidifiée à 55°C avec une solution de préhybridation (50% de formamide déionisé (v/v)/600 mM NaCl/200 µg/mL d'ARN de levure/0,25% SDS (p/v)/10 mM Tris-HCl, pH 8,0/solution de Denhardt 1×/1 mM EDTA, pH 8,0). La phase d'hybridation consistait à placer 200 µl de la solution de préhybridation avec les sondes ANRc sens et antisens appropriées (concentration finale de 1,5 µg/ml) recouvertes d'une lamelle et placées dans une chambre humidifiée pendant la nuit à 55°C.

Jour 2 : le lendemain, les lamelles ont été retirées de chaque lame via un bain contenant une solution SSC 5× à 50°C. Ensuite, une série de lavages a été effectuée : 30 mins dans du SSC 2× à 50°C, 15 min dans du SSC 2×, 15 min dans du SSC 1× et 15 min dans du SSC 0,5× à température ambiante. Les lames ont été lavées avec du PBS 1× + 0,1 % Tween pendant 10 min, puis 2 fois avec du tampon TN (100 mM Tris-HCl pH=7,5/150 mM NaCl) pendant 5 min. Les sites aspecifics ont été bloqués avec du tampon TNB (0,5% de réactif de blocage A (p/v)



(11096176001, Roche, Bâle, Suisse) dans du tampon TN) pendant 2 à 3 h à température ambiante. Les lames ont été incubées pendant la nuit avec une solution d'anticorps primaire (anticorps anti-DIG conjugué à la peroxydase (11207733910, Roche) dilué à 1:200 dans la solution TNB) à 4 °C.

Jour 3 : le lendemain, les lames ont été lavées 6 fois pendant 5 min avec du tampon TNT (Tween-20 à 0,05 % dans du tampon TN) à température ambiante. Les coupes ont été recouvertes d'un kit d'amplification du signal par du tyramine (33000, Biotium, Californie, USA) à 1:2 000 et placées dans l'obscurité pendant 12 min. Un autre cycle final de 6 lavages pendant 5 min avec du TNT (tampon TN + 0,05 % de Tween) à température ambiante a été effectué avant d'incuber les échantillons avec l'anticorps primaire de souris anti-pS6 (sc-514033, Santa Cruz, Texas, États-Unis) à une dilution de 1/200 dans du PBT pendant la nuit à 4°C.

Jour 4 : le lendemain, les coupes ont été lavées avec du PBS 1X + 0,1 % de Triton pendant 20 min à température ambiante. Ensuite, elles ont été incubées avec l'anticorps secondaire anti-souris Alexa 594 à une dilution de 1/800 (A21203, Thermo Fischer) dans du PBT pendant 1h30 à température ambiante. Les coupes ont ensuite été lavées avec du PBS 1X + 0,1% de Triton pendant 5 min à température ambiante, suivies de deux lavages de 5 min avec du PBS 1X à température ambiante. Enfin, les lames ont été montées avec du Vectashield + DAPI ou TrueView Vector (SP-8500-15, Victor laboratories, New Jersey, USA).

### 3. Résultats

#### 3.1. Activité de conjugaison d'enzymes recombinantes de GSTs

L'équipe dijonnaise avait déjà étudié la conjugaison de la PM en présence de MO ou de MN de lapins nouveau-nés *in vitro* et *ex vivo* en suivant en temps réel la formation du conjugué PM-glutathion (Legendre et al., 2014 ; Robert-Hazotte et al., 2019). En collaboration avec l'institut de chimie de l'université de bourgogne (ICMUB), nous avons évalué la conjugaison de la PM en présence de protéines recombinantes de 3 classes de GSTs (A1, M1 et P1) produits par des *Escherichia coli*. Ainsi, la PM (2M2B) a été incubé pendant 1h20 à 37°C avec chacune des 3 GSTs et du glutathion (3 répétitions/GST). Les produits de réaction ont ensuite été analysés par chromatographie liquide à haute performance (HPLC) couplée à un détecteur d'aérosols chargés (CAD). Le pic du conjugué obtenu (pA/min) a été analysé en présence et en absence de GSTs pour

pouvoir soustraire la conjugaison chimique qui peut avoir lieu naturellement entre la PM et le glutathion (Figure 15).

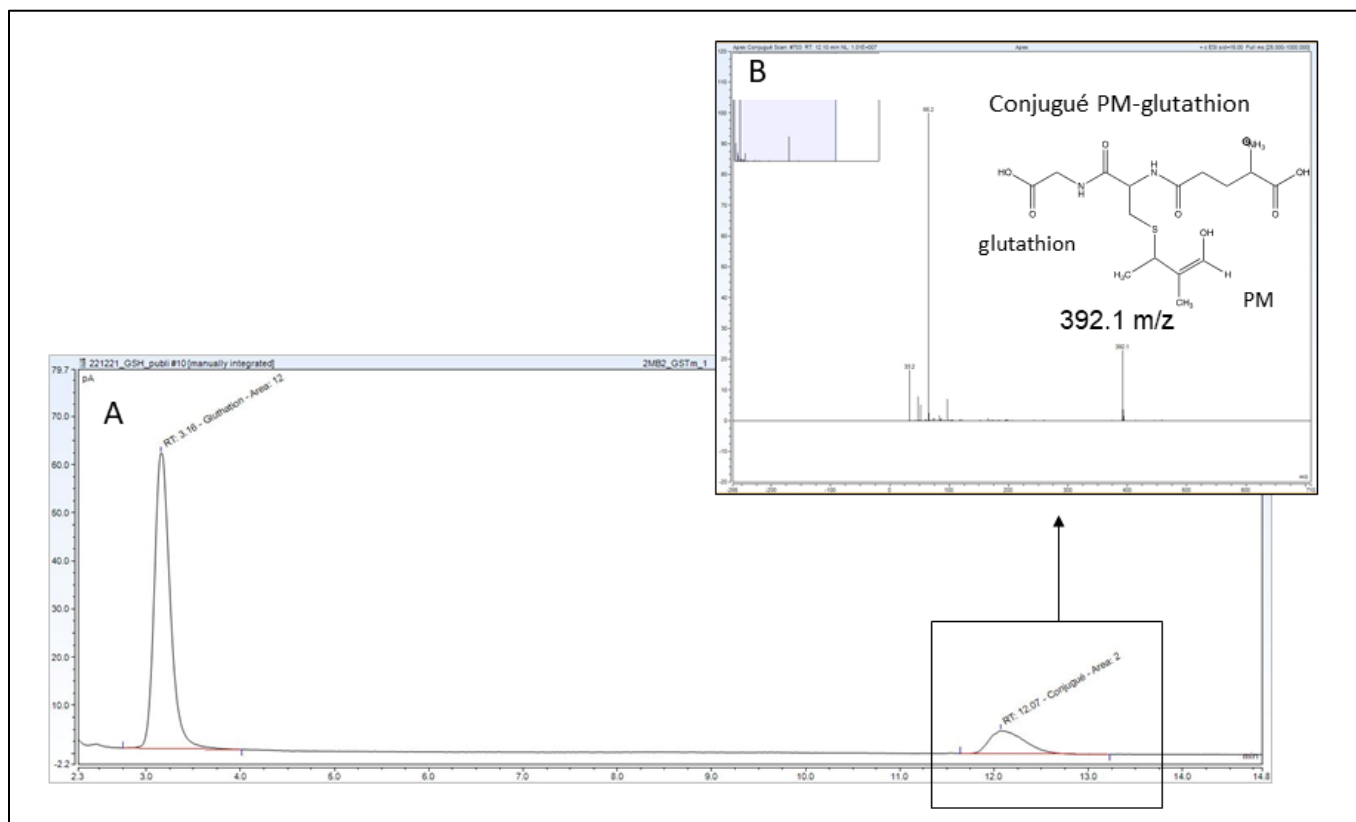


Figure 15: Chromatogramme CAD montrant le conjugué PM-glutathion après des essais enzymatiques avec la protéine recombinante GST (A). Confirmation de l'identification du conjugué (392,1 m / z) à l'aide d'un détecteur de spectrométrie de masse dans le même cycle chromatographique (B).

Nous avons trouvé que les trois classes de GSTs conjuguent efficacement la PM avec le glutathion, avec une activité de conjugaison plus élevée pour la GSTP1 (Tableau 2). Cela pourrait suggérer une plus grande affinité de la classe GSTP1 pour la PM, mais des mesures enzymologiques plus poussées sont nécessaires pour le confirmer. Nous avons ensuite vérifié l'activité de conjugaison de ces 3 classes de GSTs en présence d'un autre substrat aldéhyde, le cinnamaldéhyde (1 répétition/GST). Dans ce cas, c'est la GSTM1 qui a présenté le plus grand pic de conjugué formé, ce qui soutient un comportement distinct des GSTs en fonction du substrat.

Tableau 2: Métabolisme *in vitro* de trois classes de GSTs envers la PM et le cinnamaldéhyde, exprimé par la moyenne de l'aire du pic du conjugué formé ( $\pm$  écart-type).

GST	Péromone Mammaire		Cinnamaldéhyde	
	Moyenne conjugaison chimique	Moyenne conjugaison enzymatique	Conjugaison chimique	Conjugaison enzymatique
Alpha1	1,18 $\pm$ 0.01	3,52 $\pm$ 2.2	2,99	6,66
M1		4,14 $\pm$ 1.2		11,94
P1		11,49 $\pm$ 0.77		4,57

### 3.2. Expression des GSTs dans le mucus nasal de lapins nouveau-nés et sevrés : Etude protéomique générale

Avant d'atteindre les NSO, les odorants doivent d'abord passer dans le MN sécrété par les glandes et les cellules de l'épithélium respiratoire et olfactif. Le mucus contient essentiellement de l'eau (95%), des électrolytes, des lipides et des protéines (Bansil & Turner, 2018). Ici, nous avons réalisé une large étude protéomique permettant de comparer par groupes fonctionnels les différentes protéines retrouvées dans le MN de lapins nouveau-nés et sevrés. La distribution des protéines au sein de chaque groupe fonctionnel est représentée graphiquement sous la forme d'un diagramme circulaire (Figure 16) et la liste des principales protéines de chaque groupe est présentée en Annexe 1.

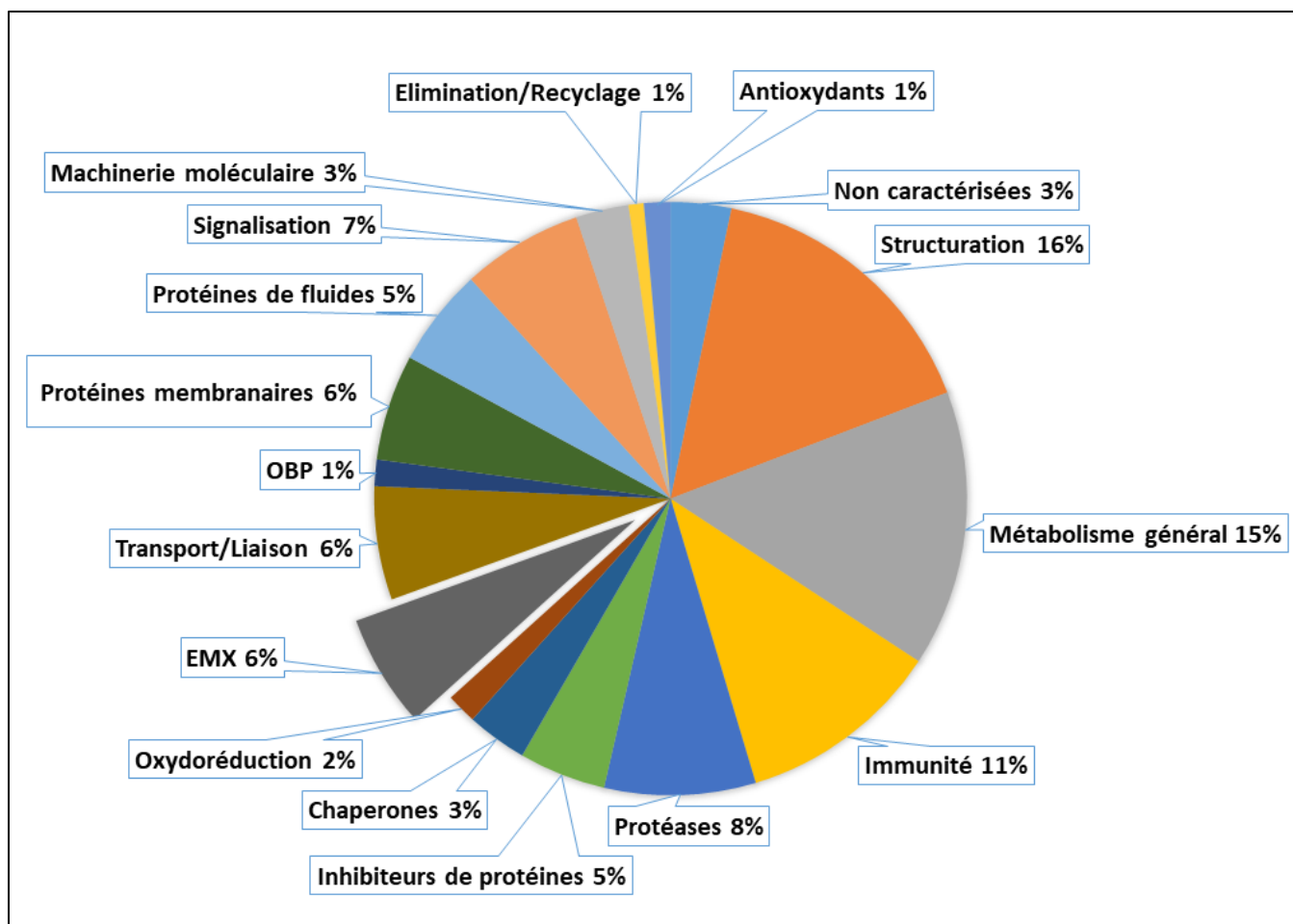


Figure 16: Pourcentage de protéines trouvées dans le mucus nasal de lapins juvéniles (nouveau-nés et sevrés, sans dissociation) selon leur fonction.

Nous avons trouvé que les majeures protéines constituant le MN des lapins juvéniles (nouveau-nés et sevrés) ont une fonction de structuration, de métabolisme et d'immunité (16%, 15% et 11% respectivement). Ces données sont conformes avec les autres études protéomiques réalisées dans le MN humain et de rats montrant une place importante de ces mêmes catégories de protéines (Casado et al., 2005; Débat et al., 2007; J.-M. Heydel et al., 2019; Yoshikawa et al., 2018a) et confortant le rôle du mucus dans l'hydratation de l'épithélium nasal et la protection contre les agents délétères tels que les bactéries toxiques ou pathogènes. Les EMXs occupent 6% des protéines constituant le MN. Les lipocalines/OBPs quant à elles représentent 1%. Ceci prouve la place des acteurs péri-récepteurs et leur importance dans l'olfaction dès la phase de traitement de l'information olfactive, dans le MN.

En comparant les protéines entre les lapins nouveau-nés et sevrés, nous avons trouvé respectivement un total de 447 vs 310 protéines, avec 272 protéines communes entre les deux groupes d'âges. Le nombre de protéines du MN du lapin nouveau-né est supérieur dans quasiment toutes les catégories fonctionnelles, en particulier la catégorie qui concerne les protéines de structuration (72 vs 51) et du métabolisme général (68 vs 40), ainsi que pour les protéases (40 vs 19) (Figure 17). Ces protéines doivent probablement jouer un rôle essentiel dans la structuration du tissu nasal et son développement à la naissance. Deux lipocalines sont présentes uniquement dans le MN de lapins sevrés, avec des poids moléculaires de 17,97 Da et 19,67 Da, et 5 autres lipocalines/OBPs sont communes aux deux groupes d'âges. Les EMXs dans le MN des lapins nouveau-nés excèdent celles identifiées dans le MN de lapereaux sevrés (27 vs. 19). La liste de ces EMXs est indiqué dans le Tableau 3.

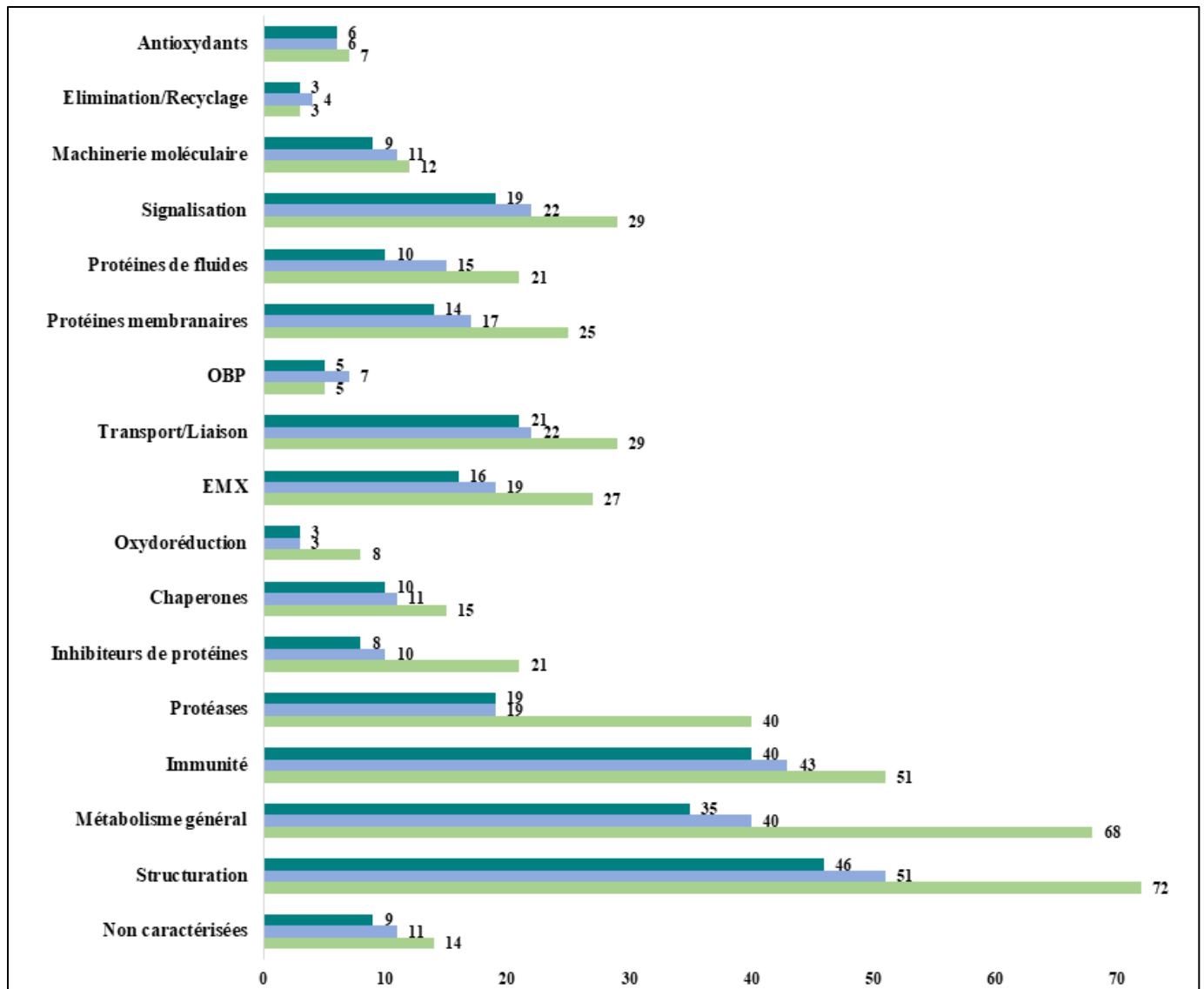


Figure 17: Nature et nombre de protéines retrouvées dans le mucus nasal de lapins nouveau-nés (NN) et sevrés (SV), ainsi que nombre de protéines communes aux deux catégories d'âge en fonction de leur groupe fonctionnel.

Tableau 3: Nombre moyen de peptides des EMXs retrouvés dans le mucus nasal de lapins nouveau-nés (NN) versus de lapins sevrés (SV).

N° accession	EMX	MW (Da)	Moyenne peptides NN	Moyenne peptides SV
G1T7S1	Aldo_ket_red domain-containing protein	37 273	0	1
G1TRK3	Morphine-6-dehydrogenase	36 715	0	1
G1SYA5	S-formylglutathione hydrolase	31 310	0	1
G1TES6	Hydroxysteroid 17-beta dehydrogenase 10	27 093	1	0
G1T760	Aldo_ket_red domain-containing protein	32 155	1	0
G1T6K0	Carboxylesterase	44 714	1	0
G1T276	Aldehyde dehydrogenase	54 366	1	0
P14943	Cocaine esterase	59 059	1	0
G1U6T1	Carboxylic ester hydrolase	61 127	1	1
Q08863	Glutathione S-transferase alpha I	25 693	1	0
G1SUY2	Aldehyde dehydrogenase 2 family member	54 463	1	0
G1TTJ1	Dehydrogenase/reductase 11	28 183	1	0
G1TDR0	Carboxylic ester hydrolase	58 787	1	0
G1U723	Aldo_ket_red domain-containing protein	36 649	1	0
G1TZV1	Carboxylic ester hydrolase	61 550	1	0
G1T7Q5	Carboxylic ester hydrolase	61 881	1	0
G1SN51	Carboxylic ester hydrolase	61 312	1	1
G1SN96	Paraoxonase	38 273	1	1
P27170	Serum paraoxonase	40 011	2	1
P12337	Carboxylesterase 1	62 293	2	0
Q9BGN0	Serum paraoxonase/lactonase 3	39 508	2	1
G1SXQ0	Glutathione transferase Mu3	32 775	2	3
P15128	Cytochrome P450 4B1	58 606	3	0
G1TNI4	Glutathione S-transferase Mu2	26 651	3	3
G1U9R0	Glutathione transferase P1	23 493	4	5
G1SND1	Flavin-containing monooxygenase	61 146	5	0
P46409	Glutathione S-transferase Mu 1	25 419	6	4
Q8MI17	Aldehyde dehydrogenase 1A1	54 342	6	6
G1T0R9	Glutathione transferase Mu3	25 499	7	5
G1TY33	Aldehyde oxidase	147 696	11	1

Parmi cette liste, nous observons des EMXs de la même classe avec des poids moléculaires identiques, comme par exemple les carboxyles ester hydrolases et les aldéhydes déshydrogénases. Ceci pourrait en fait représenter le même isoforme de protéine détectée plusieurs fois. Par contre, les EMX appartenant à la même classe et ayant des poids moléculaires différents, comme les carboxylesterases, les paraoxonases et les AKR de la liste, semblent être des isoformes différentes. Nous avons identifié une seule CYP, la CYP4B1. Cette CYP est connue pour son action à la fois dans le métabolisme des xénobiotiques et des endobiotiques tels que les acides gras (Röder et al., 2023). Les CYP sont des protéines membranaires se trouvant essentiellement au niveau des membranes des réticulums endoplasmiques et des mitochondries. Ici, la présence de la CYP4B1 dans le MN est très intéressante. Certains chercheurs ont émis l'hypothèse d'une sécrétion des CYP450 en dehors de la cellule grâce à des exosomes, mais ceci n'a pas encore été prouvé (Asakawa et al., 2017). L'AOX est l'EMX le plus retrouvée dans le MN des lapins nouveau-nés par rapport aux sevrés (11 peptides vs 1). Cette enzyme métabolise les aldéhydes aromatiques et aliphatiques. Elle pourrait se positionner comme candidat dans le métabolisme de la PM (Takaoka et al., 2022). Onze EMXs ont par ailleurs été trouvés seulement dans le MN du nouveau-né contre 3 spécifiques au sevré. Parmi ces 11 EMXs, la monooxygénase à flavine et la CYP4B1, qui sont toutes les deux des monooxygénases ayant chacune la flavine et l'hème comme cofacteurs, occupent le nombre de peptides le plus élevé. Plusieurs GSTs sont repérées dans le MN à la fois de nouveau-nés et de sevrés, tels que la GSTA1, M1, M2, M3 et P1. Leur présence dans le MN paraît identique entre les deux tranches d'âges.

Ces données montrent une composition en protéines du mucus nasal en partie dépendante de l'âge de l'animal. Les EMXs sont impliqués dès le premier stade du traitement périphérique de l'olfaction, occupant une place importante dans la composition protéique du MN. Notre analyse, bien que descriptive ici, nous a fourni une base pour la suite, étant donné que le MN est le produit de sécrétion des glandes se trouvant dans la MO. Il faut cependant noter que le MN provient à la fois de l'épithélium olfactif (EO) et respiratoire. La suite de notre étude a reposé uniquement sur l'EO de la MO.

### *3.3. Localisation des GSTs dans le tissu olfactif de lapins nouveau-nés et sevrés*

Afin de comprendre au mieux le rôle que jouent les GSTs à ces âges-là chez les lapins, il est nécessaire de les étudier au niveau de la MO, le tissu où l'on trouve les ROs et NSO supports



de la détection périphérique de signaux olfactifs, et de leur transmission vers le cerveau. Le tissu olfactif exprime divers EMXs y compris des GSTs, chez plusieurs espèces comme l'Homme (Aceto et al., 1989), le rat (Heydel et al., 2019) et la souris (Whitby-Logan et al., 2004). Par contre, la localisation des GSTs au niveau de l'EO de lapins n'avait par contre encore jamais été étudiée à ce jour jusqu'à cette thèse. De plus, le suivi de l'expression histologique des GSTs au niveau de l'EO a été étudiée uniquement chez le rat, de la phase embryonnaire jusqu'au sevrage (Krishna Rama et al., 1994). Pour cela, au niveau de l'EO de lapins nouveau-nés et sevrés, nous avons examiné la localisation des ARNm et des protéines des GSTs par immunohistochimie (IHC) et hybridation *in situ* (HIS), respectivement.

### 3.3.1. Localisation des ARNm

Nous décrivons ici la localisation des ARNm des GSTs à partir de coupes de MO de lapereaux effectuées au cryostat en utilisant la technique d'HIS en fluorescence. L'HIS est une technique de biologie moléculaire utilisée pour détecter, grâce à des sondes marquées (ici avec un fluorochrome), la présence et la localisation précise de séquences spécifiques d'acides nucléiques dans des tissus histologiques. En pratique, nous avons rencontré des impossibilités temporaires pour l'analyse de la classe Mu des GST. Ainsi, seules les GSTs des classes A1 et P1 ont été étudiées par cette technique.

La Figure 18 présente un assemblage d'images (grossissement x4) de la MO de lapins nouveau-nés nous permettant d'avoir une vue d'ensemble des 4 cornets olfactifs, ainsi qu'une image au grossissement x20 pour avoir une visibilité au niveau de l'EO pour chacun du marquage de GSTA1 (A) et GSTP1(B). Pour les lapins sevrés, nous présentons en Figure 19 uniquement des images au grossissement x20 de l'EO pour le marquage de GSTA1 (A) et GSTP1(B). Il apparaît que les ARNm de GSTA1 sont présents uniquement dans les glandes de Bowman au niveau des 4 cornets olfactifs des lapins nouveau-nés (Figure 18A). Chez les sevrés, le marquage de ces mêmes ARNm est plus étendu le long des glandes de Bowman (Figure 19A). Concernant la GSTP1, les ARNm sont marqués dans tout l'EO chez les nouveau-nés, au niveau des 4 cornets olfactifs (Figure 18B). Ce marquage est identique dans l'EO de lapins sevrés (Figure 19B). Ces résultats pointent donc une localisation cellulaire en ARNm des GSTs dans l'EO dépendant de la classe des GST et de l'âge de l'espèce.

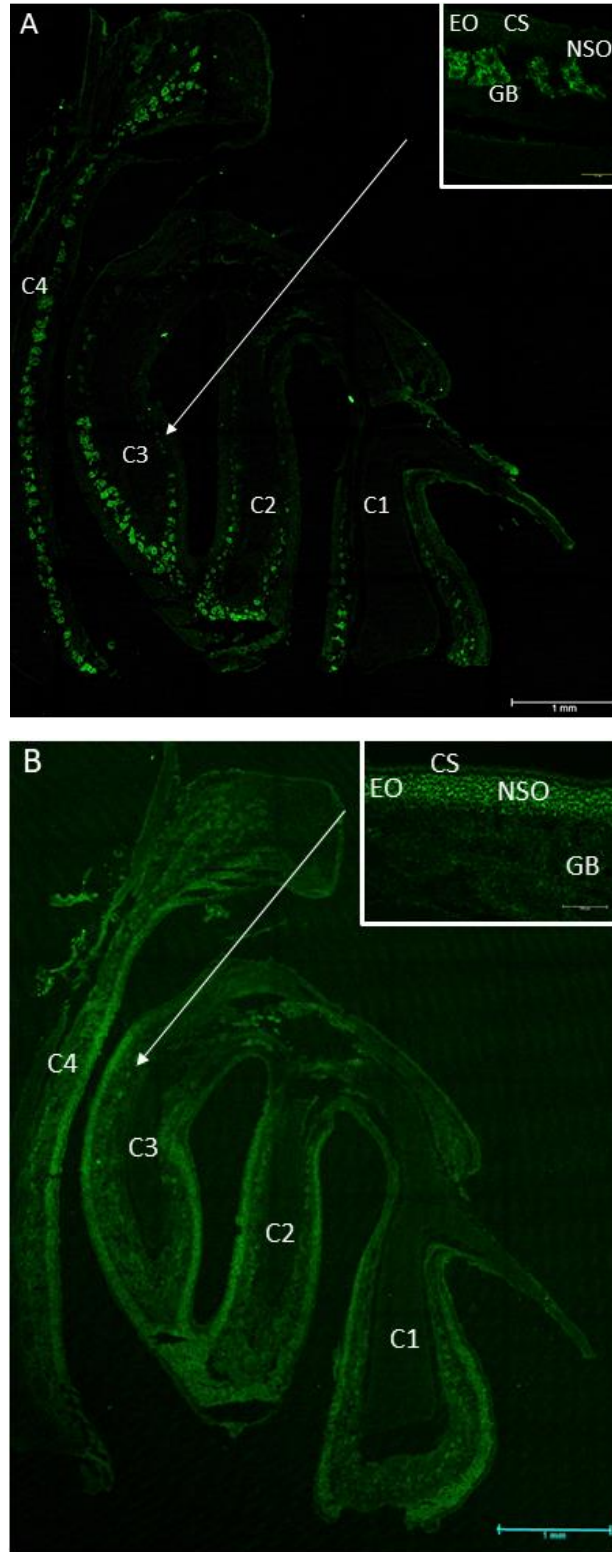


Figure 18: Hybridation in situ de GSTA1 (A) et GSTP1(B) dans la MO de lapins nouveau-nés. Mosaique d'images au grossissement x4 (1 mm) incluant une image au grossissement x20 (100μm). C1-C4 : cornets olfactifs 1 à 4 ; EO : épithélium olfactif ; CS : cellules sustentaculaires ; GB : glandes de Bowman ; NSO : neurones sensoriels olfactifs.

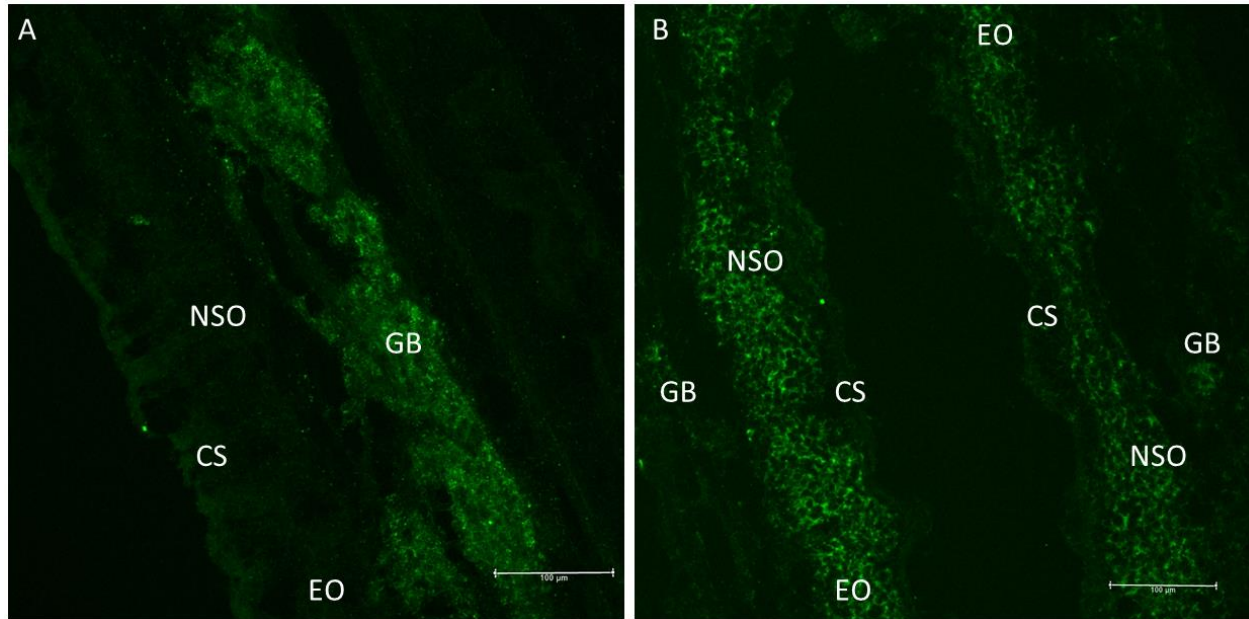


Figure 19: Hybridation *in situ* de *GSTA1* (A) et *GSTP1*(B) dans la muqueuse olfactive de lapins sevrés ( $\times 20$  ;  $100\mu\text{m}$ ). EO : épithélium olfactif ; CS : cellules sustentaculaires ; GB : glandes de Bowman ; NSO : neurones sensoriels olfactifs.

Nous avons initialement développé la technique d’HIS en fluorescence pour mettre au point une nouvelle méthode expérimentale permettant d’étudier l’interaction des EMXs avec les NSO activés au niveau de la MO. Cette méthode repose sur la colocalisation des ARNm des GSTs avec la protéine ribosomique S6 phosphorylée (PS6), une protéine cytosolique spécifique aux neurones activés par la liaison d’une odeur à son/ses récepteur/s, en couplant la technique d’HIS avec de l’IHC en fluorescence. Elle a été utilisée dans les travaux de Hiroaki Matsunami et collègues, dans le cadre de colocalisation de ROs avec les NSO activés suite à des stimulations olfactives chez la souris (Asakawa et al., 2017; de Andrade Carvalho et al., 2021). Les Figures 20 et 21 présentent respectivement les résultats du comarquage des ARNm de la *GSTA1* et *P1* (couleur verte) avec la PS6 (couleur rouge, Figures 20A et 21A) et avec le Dapi (couleur bleu, Figures 20B et 21B) dans l’EO de lapins nouveau-nés. Malgré un long travail de mise au point, nous n’avons pas pu observer de colocalisation spécifique, pour l’une comme pour l’autre de ces deux GSTs, avec la PS6 et donc avec les NSO activés. En revanche, nous avons observé une localisation des ARNm de *GSTP1* autour de la PS6 cytosolique (Figure 21A) et des noyaux des NSO (Figure 21B). Nous n’avons pas reproduit ces analyses dans la MO de lapins sevrés du faite de la lourdeur de la méthode expérimentale, en termes de temps requis.



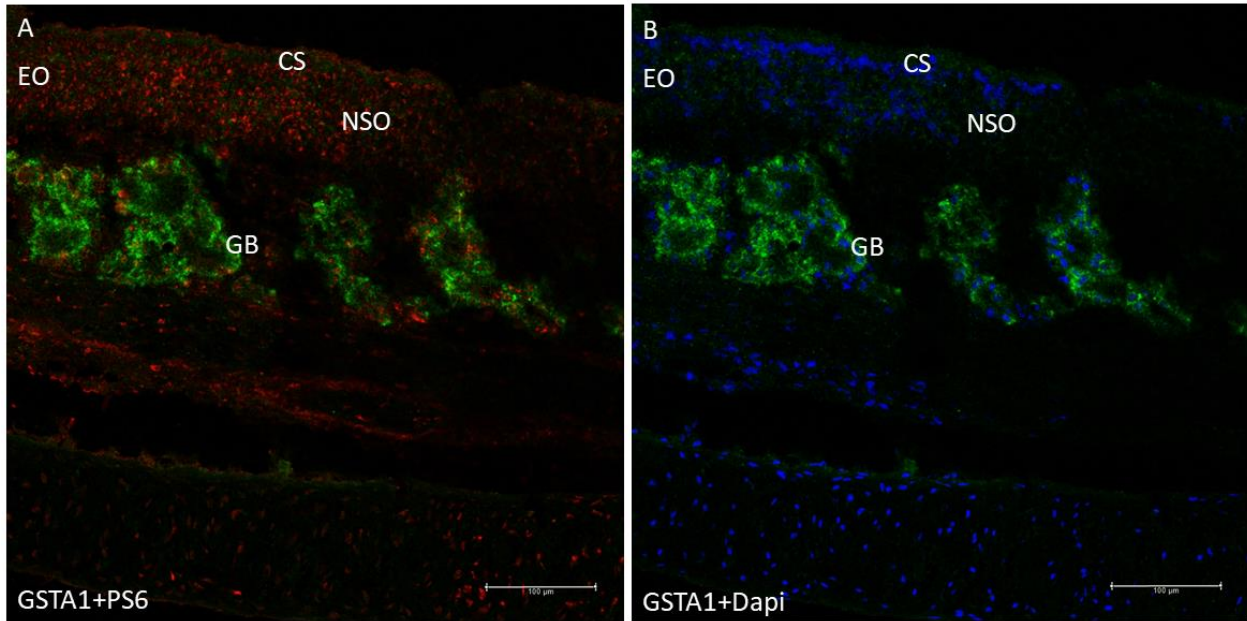


Figure 20: Co-marquage des ARNm de la GSTA1 (en vert) avec la protéine ribosomique S6 phosphorylé (en rouge) (A) et avec le Dapi (en bleu) (B) dans l'épithélium olfactif de lapins nouveau-nés (images x20 ; 100 µm). PS6 : protéine ribosomique S6 phosphorylé ; EO : épithélium olfactif ; CS : cellules sustentaculaires ; GB : glandes de Bowman ; NSO : neurones sensoriels olfactifs.

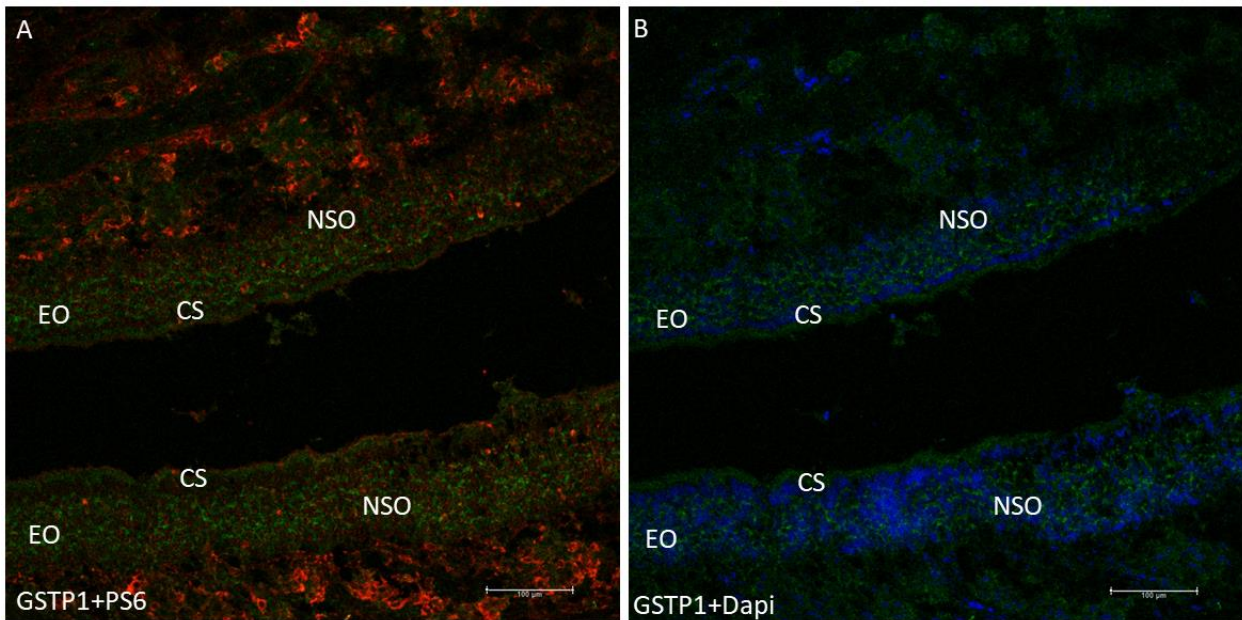


Figure 21: Co-marquage des ARNm de la GSTP1 (en vert) avec la protéine ribosomique S6 phosphorylé (en rouge) (A) et avec le Dapi (en bleu) (B) dans l'épithélium olfactif de lapins nouveau-nés (images x20 ; 100 µm). PS6 : protéine ribosomique S6 phosphorylé ; EO : épithélium olfactif ; CS : cellules sustentaculaires ; GB : glandes de Bowman ; NSO : neurones sensoriels olfactifs.

### 3.3.2. Localisation des protéines

Nous avons regardé également la localisation protéique des GSTs dans le tissu olfactif des lapins nouveau-nés versus sevrés. Pour cela, nous avons utilisé la technique d'IHC sur des coupes de têtes de lapereaux, en paraffine. L'IHC est une technique de laboratoire qui permet de localiser de manière précise des protéines particulières dans des tissus biologiques à l'aide d'anticorps marqués (à la peroxydase pour l'IHC visible et à un fluorochrome pour l'IHC fluorescente).

Nous nous sommes également concentrés sur les GSTA1 et P1 dans cette partie, car nous avons rencontré des problèmes de spécificité de l'anticorps anti-GSTM1. La spécificité des anticorps GSTA1 et GSTP1 et l'expression de la protéine ont été validées par Western blot dans 5 échantillons de MO provenant de nouveau-nés ainsi qu'avec la protéine recombinante de chaque GST (Figure 22). La spécificité de la GSTP1 n'est pas ambiguë puisqu'il n'existe qu'une seule isoforme de cette classe. La GSTP1 présentait une bande à 25 kDa dans tous les échantillons et dans la protéine recombinante (Figure 22B). La coloration de la GSTA1 a révélé une bande entre 25 et 37 kDa dans tous les échantillons, et avec la protéine recombinante de la GSTA1 (Figure 22A). Cependant, d'après les résultats obtenus sur la régulation protéique des GSTs (section 3.2.2), nous avons considéré que l'anticorps utilisé pour détecter la GSTA1 était non spécifique à l'isoforme A1 mais spécifique à la classe GSTA. Nous avons donc utilisé le terme GSTA pour parler des protéines détectées par IHC et par Western blot. De plus, malgré l'ajout du dodécylsulfate de sodium (SDS) et le chauffage, nous n'avons pas pu casser l'homodimérisation de la GSTA qui apparaît sur le gel à 50 kDa. Le même phénomène avait déjà été observé pour la GSTA1 de rat (Heydel et al., 2019).

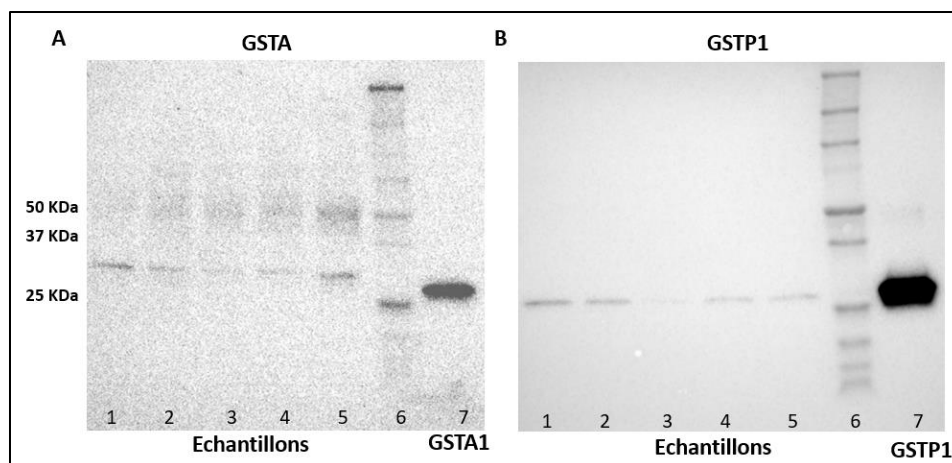


Figure 22: Western blot de GSTA (A) et GSTP1 (B) sur la muqueuse olfactive de 5 lapins nouveau-nés (lignes 1 à 5) et avec les protéines recombinées de GSTA1 et GSTP1 (lignes 7). Les lignes 6 représentent le marqueur de poids moléculaire de la protéine.

Les résultats de l'IHC ont montré un marquage de la GSTA principalement dans les glandes de Bowman chez les deux groupes d'âges de lapins (Figure 23). Cependant, comme l'HIS (Figure 19A), la GSTA1 paraît plus étendue dans les glandes de Bowman des lapins sevrés comparativement aux nouveau-nés. La GSTA paraît exprimée de façon zonale puisque la région dorsale de la MO présente une coloration plus forte (Figure 23). La protéine GSTP1 est exprimée dans les cellules sustentaculaires, les cils olfactifs, les cellules basales et les glandes de Bowman chez les nouveau-nés et les sevrés (Figure 24). Aucune expression zonale caractéristique de la GSTP1 n'a été observée dans la cavité nasale. La possibilité d'une présence nucléaire de la GSTP1 nous a poussé à réaliser un comarquage en fluorescence de la GSTP1 avec les noyaux. La colocalisation fluorescente de la GSTP1 et des noyaux a révélé la présence de protéines GSTP1 dans les noyaux des cellules sustentaculaires (couleur violette dans la Figure 25). Ce marquage a été fait seulement dans l'EO de nouveau-nés. Nous n'avons pas trouvé la GSTP1 autour des noyaux des NSO, comme pour les résultats des ARNm dans la partie précédente. Afin de s'assurer de l'emplacement des NSO au niveau de l'EO, nous avons effectué un marquage supplémentaire de la protéine marqueur olfactive (OMP) chez des nouveau-nés (voir le marquage en Annexe 2). Nous avons également réalisé un marquage de la GSTA et de la GSTP1 dans l'épithélium respiratoire de nouveau-nés et de sevrés (voir Annexe 3) car cet épithélium participe à la sécrétion du MN et représente le premier tissu entrant en contact avec les molécules odorantes. Les résultats ont montré une forte expression de la GSTA et de la GSTP1 dans ce tissu, notamment dans les cellules sécrétrices du MN (Annexe 3).



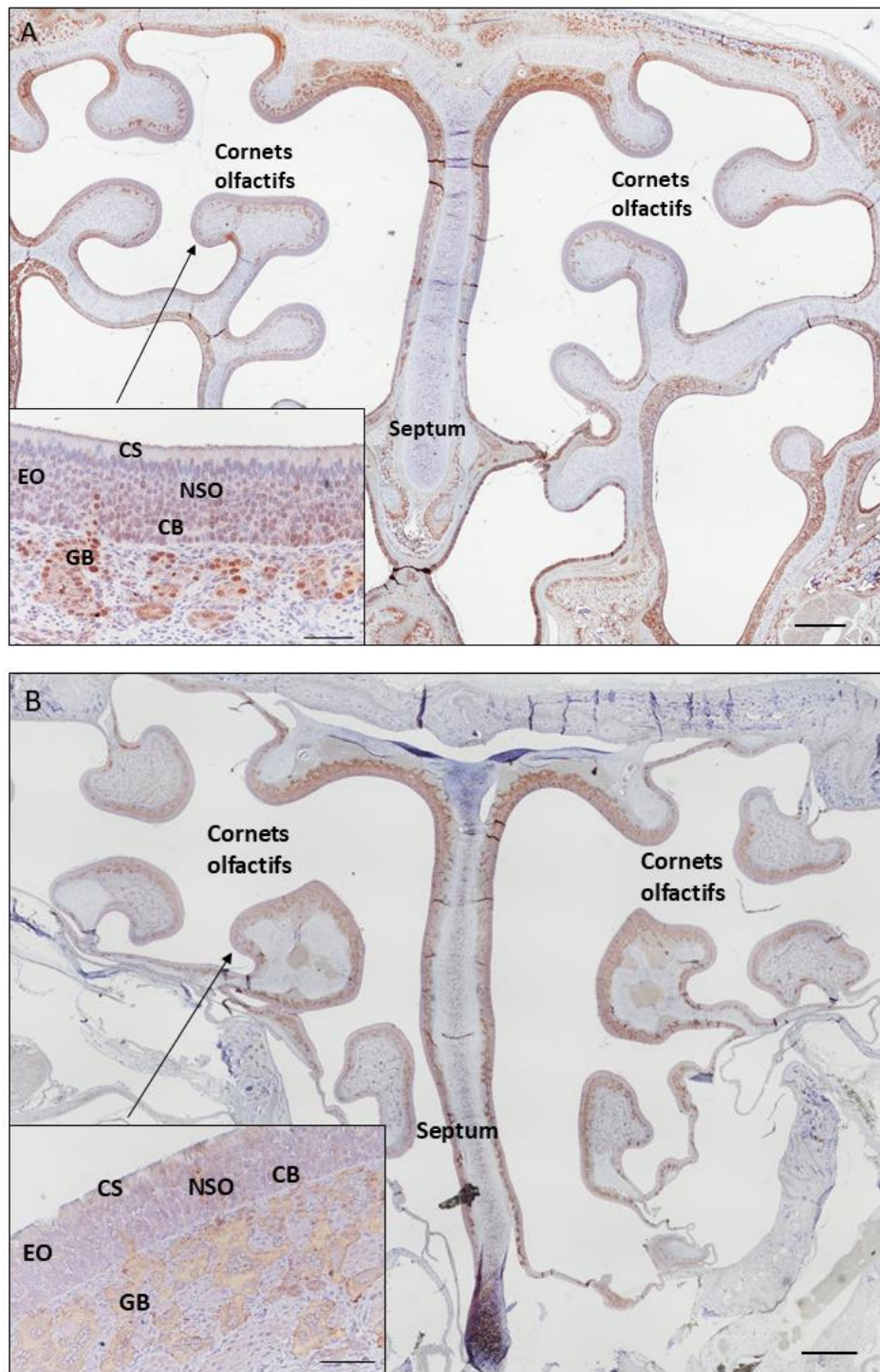


Figure 23: Immunohistochimie en visible de GSTA dans la cavité nasale de lapins nouveau-nés (A) et sevrés (B). Mosaïque d'images au grossissement  $\times 4$  ( $500\ \mu\text{m}$ ) incluant une image au grossissement  $\times 40$  de l'épithélium olfactif ( $50\ \mu\text{m}$ ) dans le coin inférieur gauche. EO : épithélium olfactif, CS : cellules sustentaculaires, NSO : neurones sensoriels olfactifs, CB : cellules basales, GB : glandes de Bowman.

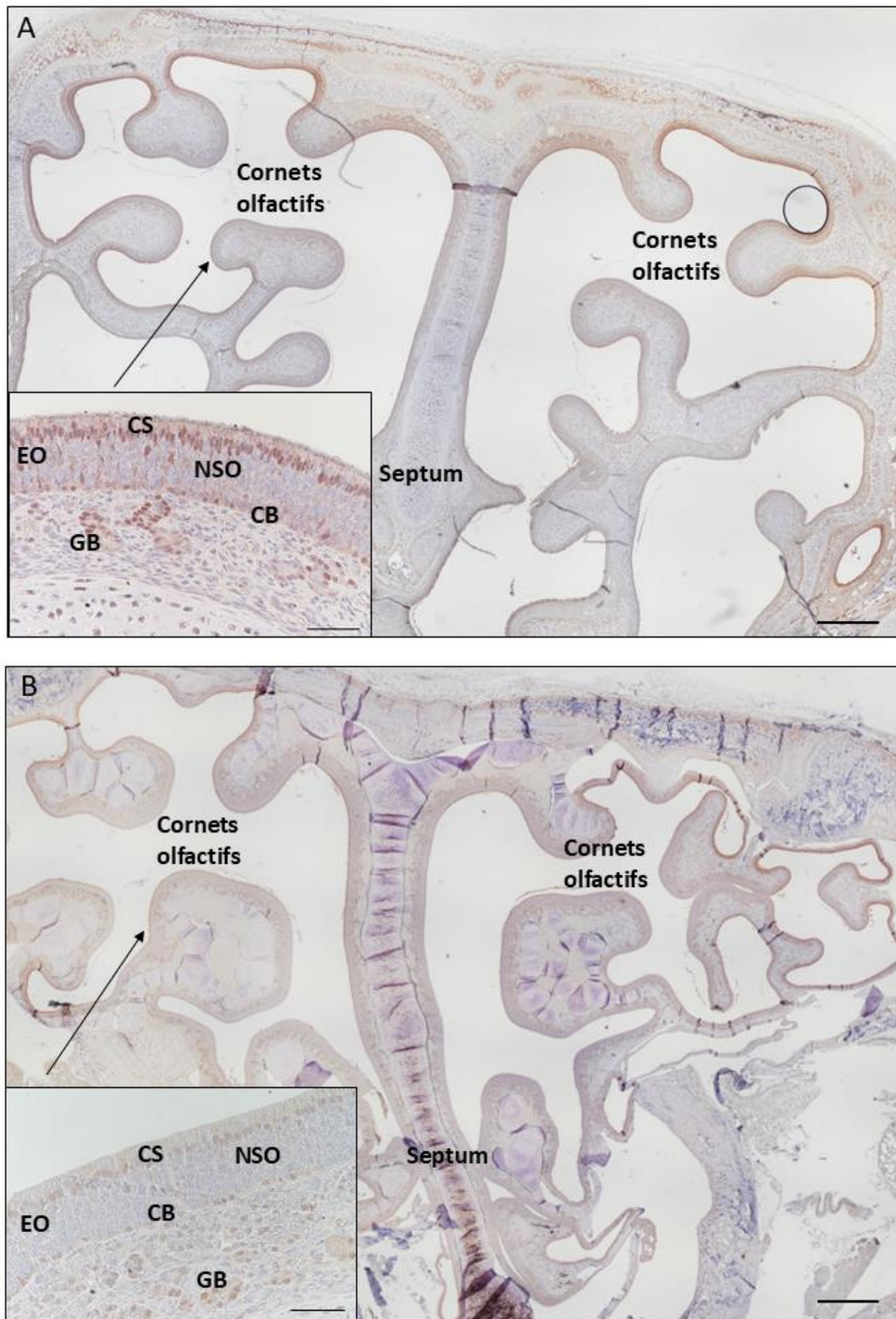


Figure 24: Immunohistochimie en visible de GSTP1 dans la cavité nasale de lapins nouveau-nés (A) et sevrés (B). Mosaïque d'images au grossissement  $\times 4$  ( $500\ \mu\text{m}$ ) incluant une image au grossissement  $\times 40$  de l'épithélium olfactif ( $50\ \mu\text{m}$ ) dans le coin inférieur gauche. EO : épithélium olfactif, CS : cellules sustentaculaires, NSO : neurones sensoriels olfactifs, CB : cellules basales, GB : glandes de Bowman.



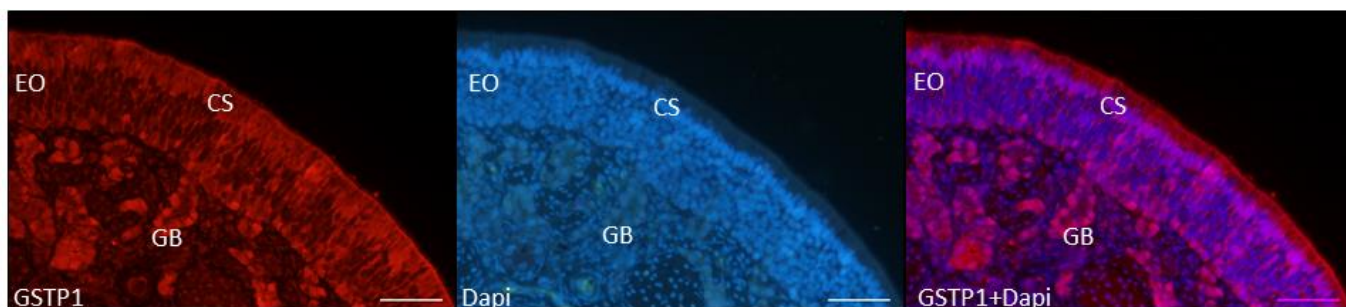


Figure 25: Immunohistochimie en fluorescence (x40 ; 50  $\mu$ m) de GSTP1 (rouge), des noyaux (bleu) et de leur colocalisation (violet) dans l'épithélium olfactif de lapins nouveau-né.. EO : épithélium olfactif, CS: cellules sustentaculaires, GB : glandes de Bowman.

### 3.4. Régulation moléculaire des GSTs

Les EMX doivent métaboliser en continue les odorants et les xénobiotiques probablement afin de garder les ROs accessibles pour tout stimulus olfactif, notamment lorsque le stimulus est d'importance vitale pour l'individu et l'espèce, comme c'est le cas pour la PM. Dans cette partie, nous avons évalué la régulation en ARNm et en protéines des 3 classes de GSTs dans la MO selon 1- une exposition de courte durée à la PM, et 2- l'âge des lapereaux (nouveau-nés versus sevrés). Pour cela, nous avons opté pour les techniques de RT-qPCR (la réaction en chaîne par polymérase quantitative en temps réel après transcription inverse) et de Western blot afin de quantifier, respectivement, les niveaux d'ARNm et des protéines régulés. La RT-qPCR est une technique précise et sensible qui repose sur la conversion de l'ARN en ADNc, puis la quantification en temps réel de l'amplification des fragments spécifiques d'ADNc à l'aide d'amorces, d'enzymes et des molécules fluorescentes. Le Ct (cycle threshold) est le cycle à partir duquel la fluorescence dépasse un seuil prédéfini, indiquant la présence détectable du produit amplifié. Plus le Ct est bas, plus la quantité d'ADNc et donc d'ARNm initiales est élevée. Le Western blot est une technique qui permet de quantifier l'intensité de bandes de protéines marquées à des anticorps, après migration sur gels en fonction de leur taille.

#### 3.4.1. Régulation des GSTs après exposition à la phéromone mammaire chez des nouveau-nés.

Nous avons d'abord évalué la régulation de l'expression des GSTs dans la MO de lapins nouveau-nés après exposition à la PM à deux concentrations différentes, une concentration réactogène comportementalement pour les lapereaux ( $10^{-5}$  g/ml), et une concentration forte non réactogène ( $10^{-2}$  g/ml) (Coureaud et al., 2004). Nous avons opté pour une durée d'exposition de 45

min afin de ne pas trop s'éloigner du temps d'exposition naturelle quotidienne de l'animal à la PM (5 min/jour durant l'allaitement). Réduire trop la durée, risquait d'empêcher l'observation de variations car la quantité d'ARNm produite aurait été trop basse, en-dessous des limites de détection de l'instrument d'analyse. Nous avons toutefois tenté une durée d'exposition de 5 ou de 15 min, mais comme attendu nous n'avons alors pas observé d'effets (voir Annexe 4).

Le Tableau 4 représente la moyenne des Ct obtenues en RT-qPCR sur des homogénats de MO de nouveau-nés (n=5/condition) pour les 3 classes de GST (A1, M1 et P1) ainsi que les deux gènes de références Actine et GAPDH. L'expression des différents gènes est stable au niveau d'un même groupe. En appliquant la formule DDCT, qui permet de comparer la moyenne des Ct par rapport aux deux gènes de références ainsi qu'aux contrôles (lapins exposés uniquement à de l'eau pendant 45 min), nous obtenons les graphes de la Figure 26. Les résultats ne montrent pas de différence en ARNm pour la GSTM1 par rapport aux contrôles, quelle que soit la concentration d'exposition à la PM. Le niveau d'ARNm de la GSTA1 a subi une augmentation de 30% (non significative) après exposition à la PM  $10^{-2}$  g/ml. Par contre, le niveau d'ARNm de la GSTP1 dans la MO des nouveau-nés a augmenté de 50% après exposition à la PM  $10^{-5}$  g/ml (p=0,026) et a presque doublé suite à l'exposition à la PM  $10^{-2}$  g/ml (p < 0,001). D'autres EMXs appartenant à la phase I s'avèrent être régulés en fonction de l'exposition à la PM, comme CYP2G1, AOX2 et AKR1B1 et B10 (Annexe 5).

*Tableau 4: Moyenne des Ct ( $\pm$  écart-type) des GST dans la muqueuse olfactive de lapins nouveau-nés exposés à l'eau (contrôle) et à la PM à la concentration  $10^{-5}$  (PM<sup>-5</sup>) et  $10^{-2}$  (PM<sup>-2</sup>) g/ml pendant 45 min (n=5). L'actine et la GAPDH sont utilisées comme gènes de référence.*

<b>Classe de GST</b>	<b>Contrôles</b>	<b>PM<sup>-5</sup></b>	<b>PM<sup>-2</sup></b>
<b>A1</b>	16.81 $\pm$ 0.25	16.79 $\pm$ 0.37	16.23 $\pm$ 0.35
<b>M1</b>	18.77 $\pm$ 0.11	16.79 $\pm$ 0.37	18.68 $\pm$ 0.09
<b>P1</b>	20.16 $\pm$ 0.19	19.52 $\pm$ 0.96	18.97 $\pm$ 0.18
<b>Actine</b>	19.78 $\pm$ 0.1	19.9 $\pm$ 0.7	19.62 $\pm$ 0.28
<b>GAPDH</b>	21.96 $\pm$ 0.25	21.82 $\pm$ 0.86	21.63 $\pm$ 0.12

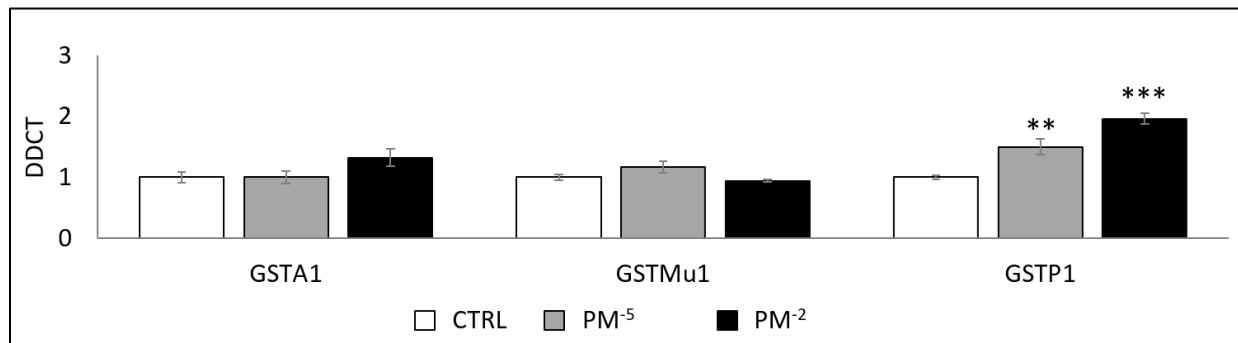


Figure 26: Expression des ARNm des GSTs dans la muqueuse olfactive de lapins nouveau-nés après exposition à la PM pendant 45 min à la concentration  $10^{-5}$  ( $PM^{-5}$ ) et  $10^{-2}$  ( $PM^{-2}$ ) g/ml par rapport à des lapereaux exposés à de l'eau (contrôles) ( $n=5$ /condition). Comparaison avec la formule DDCT. \*\*\* :  $p < 0.001$ , \*\* :  $p < 0.01$

Dans ces mêmes conditions expérimentales, nous avons analysé la régulation protéique de GSTA et de GSTP1 par Western Blot. Le marquage de la GSTM1 n'a pas été réalisé, du fait d'un défaut de spécificité de l'anticorps, comme déjà précisé. Les résultats du marquage des bandes protéiques de la GSTA sont présentés Figure 27 et ceux de la GSTP1 Figure 28. La bande de l'homodimère de la GSTA interfère avec la bande de la protéine de référence, la tubuline, à 50 kDa. Nous avons ainsi marqué la tubuline sur un autre gel, préparé en simultanément, avec les mêmes conditions expérimentales (Figure 27). Les marquages de la GSTP1 et de la tubuline ont été réalisés sur les mêmes gels (Figure 28).

Nous ne retrouvons aucune différence d'intensité entre les bandes de GSTA de lapins exposés à la PM  $10^{-5}$  g/ml (Figure 27A), à la PM  $10^{-2}$  g/ml (Figure 27B) et à l'eau (groupe contrôle). Par contre, il y a eu apparition d'une deuxième bande de GSTA directement sous la première sous-unité à la concentration  $10^{-2}$  g/ml de PM (Figure 27B). L'analyse de l'intensité des bandes de la GSTP1 a révélé une augmentation significative dans la MO des nouveau-nés après exposition à la PM  $10^{-2}$  g/ml comparativement aux contrôles ( $p = 0,031$ , contrôles =  $0,78 \pm 0,08$  vs.  $PM^{-2} = 1,022 \pm 0,19$ ).

Nous avons complété ces analyses de régulation moléculaire par de l'IHC et de l'HIS dans la MO de nouveau-nés exposés à la PM  $10^{-5}$  g/ml (Annexe 6). Aucune différence n'est apparue pour GSTA1 et GSTP1 en comparant visuellement le marquage avec les animaux contrôles exposés à de l'eau.

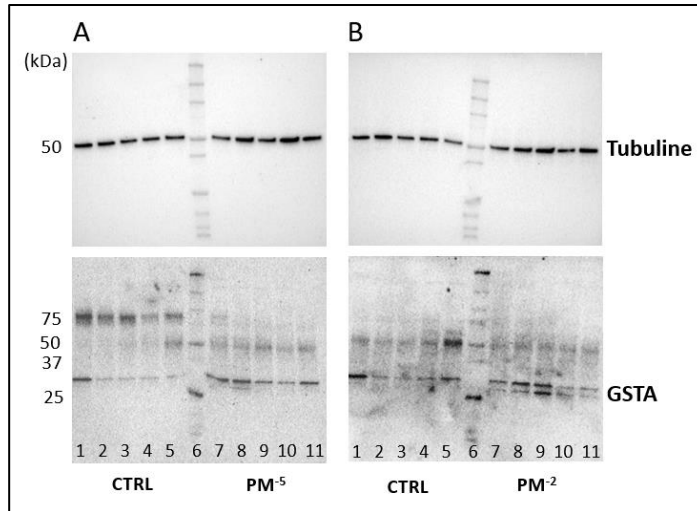


Figure 27: Western blot de GSTA (gels inférieurs) et de Tubuline (gels supérieurs) dans la muqueuse olfactive de lapins nouveau-nés contrôles ( $n=5$ ) exposés à l'eau (lignes 1 à 5) et de nouveau-nés exposés à la PM (lignes 7 à 11) à  $10^{-5}$  (A) ou  $10^{-2}$  (B) g/ml pendant 45 min ( $n=5$ /groupe). Les marqueurs de poids moléculaire des protéines sont indiqués dans la ligne du milieu (ligne 6).

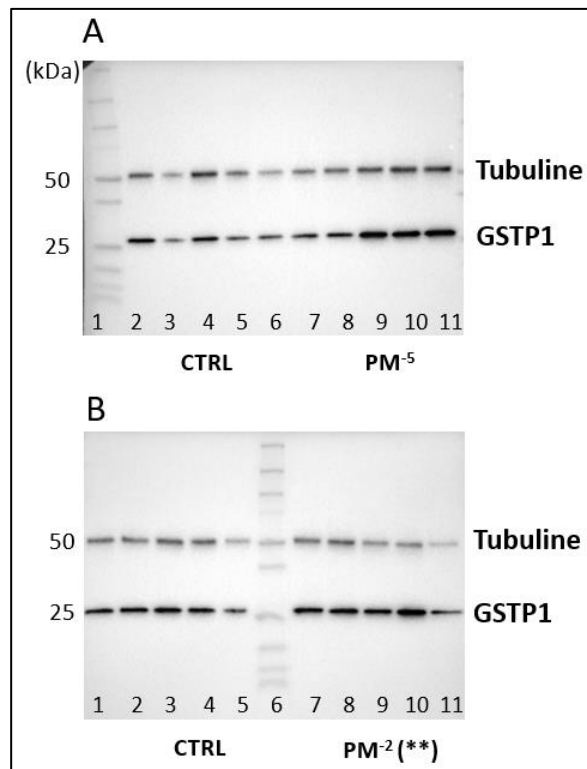


Figure 28: Western blot de GSTP1 et de Tubuline sur les mêmes gels dans la muqueuse olfactive de 5 lapins nouveau-nés contrôles exposés à l'eau (lignes 2-6 gels supérieurs et lignes 1-5 gels inférieurs) et 5 exposés à la PM à  $10^{-5}$  (A) ou  $10^{-2}$  (B) g/ml (lignes 7-11) pendant 45 min. Les marqueurs de poids moléculaire des protéines sont indiqués ligne 1 pour A et ligne 6 pour B.

### 3.4.2. Régulation des GSTs avec l'âge

Après avoir précédemment décrit l'expression des GSTs dans le MN et leur localisation en ARNm et en protéines au niveau de la MO chez des lapins nouveau-nés et sevrés, nous avons comparé ici l'expression des GSTs dans la MO à ces deux âges en utilisant les mêmes techniques de RT-qPCR et de Western blot que celles mentionnées précédemment.

Le Tableau 5 présente la moyenne des Ct des 3 GSTs et des deux gènes de références, l'actine et la GAPDH, obtenues en RT-qPCR dans des homogénats de MO de 5 lapins nouveau-nés et 5 sevrés. La Figure 29 représente le DDCT qui compare l'expression des GSTs dans la MO des sevrés par rapport aux nouveau-nés. Une augmentation d'un pas de 2 s'observe dans l'expression de l'ARNm de la GSTA1 au sein de MO des sevrés par rapport aux nouveau-nés (valeur  $p=0,011$ ) (Figure 29). Aucune différence n'est en revanche visible avec les GSTM1 et P1 entre ces deux âges. La CYP2G1 est surexprimée dans le tissu olfactif de lapins sevrés, avec un écart de 50% en plus comparativement aux nouveau-nés (voir l'Annexe 7 qui contient également des analyses RT-qPCR pour d'autres EMXs). En comparant l'intensité des bandes protéiques par Western Blot, l'expression de la protéine GSTA dans la MO des lapins sevrés augmente significativement par rapport aux nouveau-nés (valeur  $p=0,001$ , contrôles =  $0,37\pm 0,14$ , sevrés =  $1,13\pm 0,32$ ), avec la génération de deux bandes cohérentes l'une en dessous de l'autre entre les bandes marqueurs de taille correspondant à 25 et 37 kDa (Figure 30). De même, la GSTP1 n'a pas subi de régulation protéique à cet âge (Figure 31). La GSTM1 n'a pas été étudiée en Western blot pour la même raison que précédemment.

Tableau 5: Moyenne des Ct ( $\pm$  écart-type) des GSTs dans la muqueuse de lapins nouveau-nés (NN) et sevrés (SV) ( $n = 5/\text{groupe}$ ). L'actine et la GAPDH étaient utilisées comme gènes de référence.

Classe de GST	NN	SV
<b>A1</b>	17.43 $\pm$ 0.48	15.38 $\pm$ 0.76
<b>M1</b>	19.35 $\pm$ 0.36	18.73 $\pm$ 0.44
<b>P1</b>	20.43 $\pm$ 0.49	19.78 $\pm$ 0.21
<b>Actine</b>	20.7 $\pm$ 0.36	20.05 $\pm$ 0.14
<b>GAPDH</b>	22.13 $\pm$ 0.62	21.78 $\pm$ 0.22

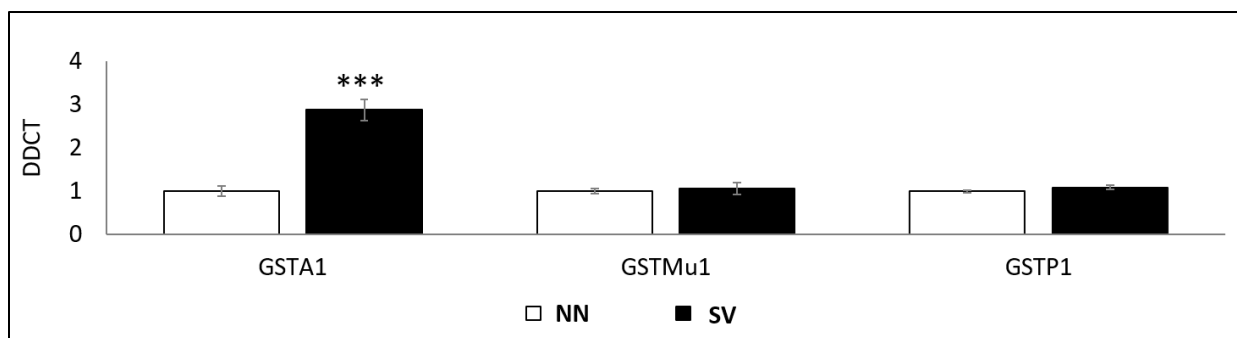


Figure 29: Expression des ARNm des GSTs dans la muqueuse olfactive de lapins sevrés (SV) par rapport à des nouveau-nés (NN) (n=5/condition). Comparaison avec la formule DDCT.

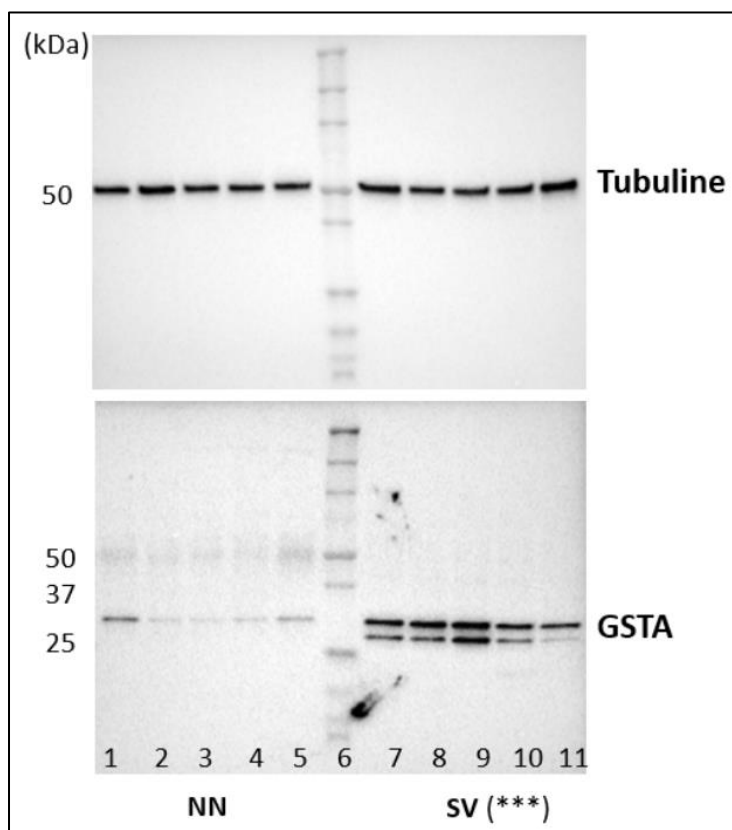


Figure 30: Western blot de GSTA (gel inférieur) et de Tubuline (gel supérieur) dans la muqueuse olfactive de 5 lapins nouveau-nés (NN, lignes 1 à 5) et 5 lapins sevrés (SV, lignes 7 à 11). Le marqueur de poids moléculaire des protéines est indiqué dans la ligne du milieu (ligne 6).

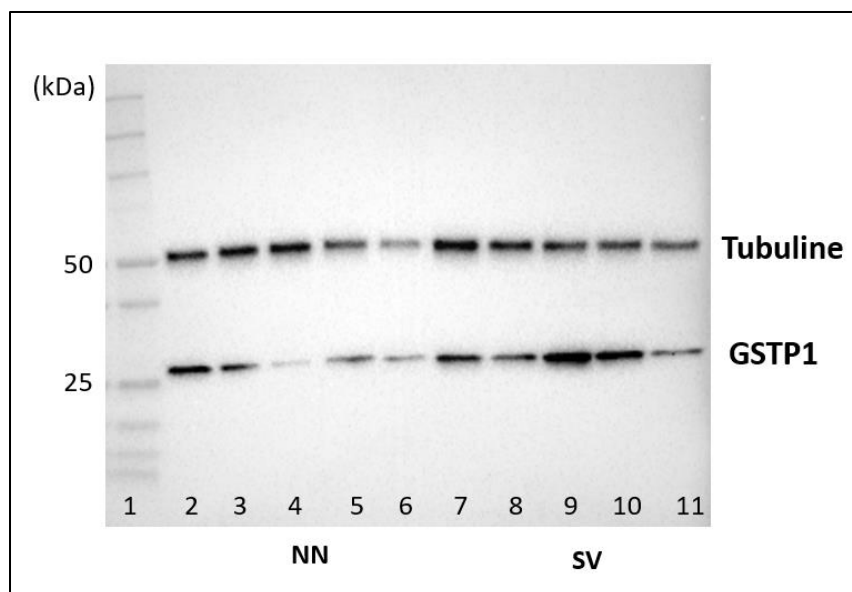


Figure 31: Western blot de GSTP1 et de Tubuline sur les mêmes gels dans la muqueuse olfactive de 5 lapins (NN, lignes 2 à 6) et 5 lapins sevrés (SV, lignes 7 à 11). Le marqueur de poids moléculaire des protéines est indiqué dans la première ligne (ligne 1).

#### 4. Discussion partielle

Cette première étude de ma thèse a permis l'exploration d'aspects biochimiques spécifiques aux enzymes glutathion transférases (GSTs) à travers différentes techniques chimiques, histologiques et moléculaires *in vitro* et *in vivo*, cela afin de mieux comprendre leur implication dans le métabolisme influençant la perception phéromonale et le comportement orocéphalique subséquent des lapins nouveau-nés.

Nous avons focalisé notre étude sur les principales classes enzymatiques de la famille des GSTs, à savoir les classes Alpha, Mu et Pi, en particulier sur l'isoforme 1 de chaque classe. Pour certaines expériences, notamment l'IHC et le Western blot, nous avons fait référence à la classe A sans spécifier l'isoforme. Cette approche a été adoptée en raison de problèmes d'interférence de l'anticorps avec d'autres isoformes (comme l'isoforme A2). La GSTM1 n'a pas été incluse dans les analyses d'IHC, d'HIS et de Western blot. Cette exclusion est due à diverses contraintes techniques et pratiques. La classe Pi ne comprenant qu'une seule isoforme, appelée GSTP1, nous avons pu l'étudier de manière exhaustive en utilisant toutes les techniques expérimentales sans risque de confusion.

Nous avons tout d'abord évalué l'activité enzymatique de chacune des GSTA1, M1 et P1, dans des conditions *in vitro* à travers l'utilisation d'enzymes recombinantes, en évaluant la formation du produit de conjugaison par la technique d'HPLC-CAD. Nous avons montré que les protéines recombinantes des trois classes de GST peuvent métaboliser la PM, bien que la GSTP1 soit potentiellement plus efficace dans nos conditions expérimentales. Nos résultats suggèrent que l'activité enzymatique de ces 3 GSTs dépend du substrat en question. Ces résultats confirment que les GSTs sont responsables de l'activité de conjugaison retrouvée précédemment dans la MO de lapin nouveau-nés (Legendre et al., 2014 ; Robert-Hazotte et al., 2019).

Pour mieux comprendre le rôle du métabolisme olfactif à cet âge et son impact sur la réactivité des lapereaux à la PM, nous avons examiné l'expression et la localisation des GSTs dans le MN et la MO de nouveau-nés. Ces analyses ont, par ailleurs, été menées de façon comparative chez des lapins sevrés âgés de 30-31 jours, donc qui avaient commencé à consommer de l'alimentation solide ; âge par ailleurs connu pour voir les jeunes lapins ne répondant plus à la PM par le comportement orocéphalique typique (Coureaud et al., 2008).

Notre analyse protéomique du MN a révélé la présence de plusieurs GSTs chez les lapins nouveau-nés et sevrés, notamment les GSTA1, M1, M2, M3 et P1. Ces données confirment les résultats du marquage de la GSTA et de la GSTP1 dans les glandes de Bowman du tissu olfactif et dans les cellules sécrétrices du tissu respiratoire. Des études protéomiques antérieures sur le MN humain et de rat avaient déjà identifié diverses GSTs, particulièrement dans le cadre de changement liés à l'âge (Heydel et al., 2019 ; Yoshikawa et al., 2018). Notre recherche se distingue cependant comme étant, à notre connaissance, la première étude protéomique globale menée sur une espèce mammalienne comparant spécifiquement les stades de la naissance et du sevrage. Les résultats soulignent l'évolution dynamique du profil protéique du MN au cours du développement précoce, en particulier la composition protéique en EMX de la phase I qui nous intéresse ici.

La localisation des ARNm et des protéines des GSTs dans le tissu olfactif s'avère dépendre de la classe de GST. Ainsi, les ARNm de la GSTA1 sont exprimés fortement dans les cellules des glandes de Bowman se situant dans la *lamina propria*, mais aucune expression claire de d'ARNm ne s'observe dans les cellules du canal sécréteur. Concernant la protéine GSTA, une forte expression est notée de la *lamina propria* à la surface de l'EO, ce qui suggère qu'après traduction de l'ARNm, les protéines GST sont transférées de la glande aux cellules du canal sécréteur,



probablement par endocytose ou par des mécanismes d'exosomes qui restent à élucider. Les lapins sevrés présentaient un marquage plus étendu au niveau des glandes de Bowman, probablement dû à la taille du tissu, plus large à cet âge. Aucune expression de la protéine GSTA n'a été détectée dans les cellules sustentaculaires, ce qui limite son expression aux glandes de Bowman chez les lapins juvéniles; chez les rongeurs (nouveau-nés et adultes) et les humains adultes, les GSTs sont exprimées principalement dans les cellules sustentaculaires ( Krishna et al., 1994; Green et al., 2005; Heydel et al., 2019; Schwartz et al., 2020). En plus de la localisation tissulaire, une expression zonale de la GSTA a été détectée dans la région dorsale de la cavité olfactive. L'expression zonale des EMXs, y compris des GSTs, à travers les cornets de la cavité nasale a été précédemment rapportée, suggérant que le métabolisme de certains types de substrats suit une topologie nasale (Miyawaki et al., 1996; Whitby-Logan et al., 2004; Heydel et al., 2019) .

La GSTP1, quant à elle, a été retrouvée dans la partie nucléaire des cellules sustentaculaires. Une telle localisation nucléaire des GST fait l'objet de description dans la littérature depuis deux décennies (Stella et al., 2007; Tamura et al., 2007). Le stress oxydatif peut déclencher la translocation nucléaire de la GSTP1 dans les cellules cancéreuses du côlon humain (Kamada et al., 2004). La translocation de la GSTP1 a également été observée pendant la maturation des oligodendrocytes chez le rat (Tamura et al., 2007). Dans ce contexte, et à notre connaissance, notre travail constitue la première observation d'une telle localisation nucléaire pour la classe P1 des GST dans les cellules sustentaculaires de l'EO. Les cellules sustentaculaires, également appelées cellules de soutien, sont essentielles pour le soutien structurel, métabolique, de détoxification et de régénération des NSO (Liang, 2020; Verma et al., 2022). Cette expression et cette translocation significatives de la GSTP1 chez les lapins nouveau-nés et sevrés suggèrent fortement un rôle dans la protection de l'homéostasie des cellules sustentaculaires et, par conséquent, de l'ensemble de l'EO, qui pourrait donc être nécessaire à cette étape du développement périnatal. D'après nos résultats, GSTP1 est également localisé dans les cellules basales, les glandes de Bowman et leurs canaux ainsi que dans les cils olfactifs. Ce résultat est cohérent avec l'analyse d'HIS qui montrait une large répartition cytoplasmique de l'ARNm GSTP1 dans l'ensemble des cellules de l'EO. Par contre, la localisation des ARNm de la GSTP1 autour des noyaux des NSO reste à élucider.

En plus de nos résultats histologiques, nous avons développé une méthode innovante permettant de colocaliser les EMXs avec les NSO. Cette technique combine l'HIS et l'IHC. Cette

approche nous offrira la possibilité d'étudier les interactions enzymes-neurones dans divers contextes olfactifs. Malheureusement, nous n'avons pas pu explorer ces interactions en profondeur au cours de cette thèse, ce qui constitue une perspective importante pour les recherches futures.

L'expression des GSTs dans la MO reste qualitative avec les données histologiques. Elle ne permet pas de comparer lapins nouveau-nés et sevrés. Aussi, nous avons opté pour des techniques d'analyses quantitatives nous permettant, elles, de comparer les niveaux d'expression moléculaire des GSTs à ces deux phases du développement. Les analyses ont montré une plus grande expression des ARNm de la GSTA1 chez les sevrés que chez les nouveau-nés. De même, la classe GSTA a augmentée significativement dans le tissu olfactif de lapins sevrés avec l'apparition d'une deuxième bande que nous soupçonnons être une autre isoforme de la GSTA. En effet, il a montré dans d'autres études que les anticorps dirigés contre les GST de mammifères ciblent différentes isoformes de la même classe (Heydel et al., 2019), bien que dans notre cas le fournisseur de l'anticorps précise qu'il s'agit de l'isoforme 1. L'isoforme GSTA1 devrait avoir une masse de 25 691 Da, et une masse de 25 450 Da est prévue pour l'isoforme GSTA2 (numéro UniProt : Q08862), ce qui correspond probablement à la bande inférieure apparue sur le Western blot. Pour s'assurer de cela, il faudrait tester l'anticorps avec la protéine recombinante GSTA2. La raison de l'apparition d'un autre isoforme n'est pas claire, mais comme il ne concerne que la classe Alpha, on peut émettre l'hypothèse que cette enzyme peut être importante pour le processus sensoriel ou de détoxification vis-à-vis de substrats spécifiques pendant la période singulière du développement que constitue le sevrage.

Plusieurs études ont été menées dans la littérature sur la régulation des gènes des ROs ou d'autres gènes impliqués dans les processus de perception des odorants, y compris les EMX, et différentes stratégies, telles que l'exposition binarinale aux odorants ou l'occlusion unilatérale d'une narine pour stimuler/réduire l'activité, ont été utilisées (Thiebaud et al., 2013; Cadiou et al., 2014; Horgue et al., 2022). De notre côté, nous avons décidé d'étudier la régulation des GSTs chez les lapins nouveau-nés après exposition à la PM. Dans les études impliquant l'exposition à des odorants, les animaux sont habituellement exposés aux stimuli pendant des heures, des jours voire des semaines. Ici, nous n'avons employé qu'une courte durée de quelques dizaines de minutes, afin de nous rapprocher de la situation de perception écologique de la PM par les lapereaux. Nous avons observé une augmentation significative de l'expression des ARNm et des protéines de la

GSTP1 dans les 45 minutes d'exposition. La surexpression protéique signifie que la régulation commence avant 45 minutes, ce qui met en évidence la haute réactivité des gènes olfactifs impliqués dans les événements périrécepteurs. La régulation semble dose-dépendante puisqu'elle est plus forte à la concentration  $10^{-2}$  g/ml qu'à  $10^{-5}$  g/ml de la PM. Ce résultat montre pour la première fois une régulation des EMXs par leur substrat dans un contexte quasi écologique de stimulation sensorielle. La localisation nucléaire de GSTP1 soutient potentiellement une fonction de protection de l'ADN des cellules sustentaculaires; ici, l'exposition à une molécule chimique comme la PM peut être perçue comme une « attaque toxique ». L'induction de l'expression de GSTP1 contre cette attaque est logique. En même temps, cette induction est susceptible de conduire à une élimination plus efficace de la PM pour éviter son accumulation dans l'environnement des récepteurs, préservant ainsi la sensibilité sensorielle à la PM. Ces résultats soutiennent ainsi l'idée d'une coévolution probable des fonctions de détoxification et sensorielle des EMXs dans la MO.

En plus de nos observations sur la régulation des GSTs, nous avons constaté une induction similaire avec l'âge et l'exposition à la PM pour certaines EMXs de la phase I, en particulier pour CYP2G1. Bien que nous n'ayons pas approfondi cette voie pour nous concentrer sur les GSTs, la littérature indique que les mécanismes d'induction des CYP et des EMXs de phase II, telles que les GSTs, peuvent être parallèles afin de permettre une coordination dans la réponse aux xénobiotiques et aux stress environnementaux (Butler et al., 1992).

Pour conclure, le tissu olfactif et le mucus nasal des lapereaux expriment fortement les enzymes impliquées dans le métabolisme de la PM, et ce métabolisme a été ici validé en utilisant des GSTs recombinantes. Nos résultats indiquent une localisation enzymatique spécifique des GSTs et révèlent une plasticité dépendante de l'exposition au substrat et de l'âge des lapereaux. Cette organisation pourrait être le fruit d'une évolution visant à optimiser l'équilibre entre les fonctions de détoxification et sensorielle des GSTs. Ainsi, elle permettrait de maintenir une efficacité maximale de la muqueuse olfactive pour traiter le signal biologique phéromonal crucial à la naissance, tout en s'adaptant à l'atténuation de la valence de ce signal au cours du développement avec l'introduction de l'alimentation solide.

---

## *Etude II*

---

### *Influence de la concentration d'apprentissage et de la volatilité des odorants sur leur gamme de perception post-conditionnement*

#### *1. Introduction*

Si le monde olfactif qui nous entoure se caractérise par la complexité quantitative et la diversité qualitative des stimuli plus ou moins complexes qui le constituent (odorants, mélanges d'odorants), et leur renouvellement permanent, le paramètre intensitif (concentration) de ces stimuli vient encore compliquer la compréhension de sa perception. Une stimulation olfactive doit en effet avant tout pouvoir être détectée, avant d'être discriminée et perçue comme porteuse d'une qualité particulière, malgré ses possibles variations de concentrations inhérentes à la localisation de sa source et à sa volatilité. Dans cette seconde étude, ma thèse s'est intéressée à la notion d'intensité du signal olfactif, cela dans le cadre de l'apprentissage PM-induit, en s'interrogeant sur l'impact de la concentration du stimulus conditionné sur son apprentissage par les lapins nouveaux, impact pouvant intervenir lors du conditionnement et/ou au moment du test de rétention (24h plus tard). Comme évoqué dans notre introduction générale (section D3.3), il avait été récemment mis en évidence (Duchamp-Viret et al., 2021) qu'un seul épisode de conditionnement stimulus conditionné (SC) + PM suffisait à engendrer une plasticité à l'échelle du système périphérique du lapereau, plasticité illustrant le phénomène dit d'induction (Wysocki et al., 1989). Ici, afin d'explorer plus avant l'influence de la concentration du SC sur la sensibilité olfactive des lapereaux et leurs capacités de reconnaissance de celui-ci post-apprentissage, nous avons cherché à déterminer les seuils de détection et la gamme de réactivité des lapereaux dans le cas de deux odorants choisis pour représenter deux catégories de volatilités opposées : l'isobutyrate d'éthyle (odorant A, ayant une qualité fraise pour le nez humain), et l'éthyl maltol (odorant B, ayant une qualité caramel chez l'Homme). A est très fortement volatil, sa pression de vapeur saturante étant élevée, 25,4 mm Hg ( $3,39 \times 10^3$  pa), alors que B est faiblement volatil, sa pression de vapeur saturante étant faible,  $1,45 \cdot 10^{-4}$  mm Hg ( $1,93 \times 10^{-2}$  pa).

Lors de nos sessions d'apprentissage, nous avons utilisé la PM comme agent renforçant à la concentration fixe de  $10^{-5}$  g/ml (concentration optimale pour l'apprentissage; Coureaud et al., 2006), et avons conditionné plus de 300 lapereaux répartis en groupes distincts. Chacun des

groupes était conditionné à une concentration différente de SC, à savoir une concentration comprise entre  $10^{-2}$  et  $10^{-23}$  g/ml pour l'odorant A, et  $10^{-2}$  à  $10^{-22}$  pour l'odorant B. Ces gammes de concentration explorées comportaient des concentrations exceptionnellement basses, à notre connaissance encore jamais testées à ce jour chez un mammifère, même adulte. Les tests de rétention consistaient en un test d'activation orale (procédure préalablement décrite section Section D3.1 de l'introduction de ce manuscrit) effectué 24h après le conditionnement, comme cela est classiquement fait dans les études portant sur l'apprentissage PM-induit et la mémoire olfactive générée menées chez le lapereau (e.g., Coureaud et al., 2009, 2011, 2013, 2014, 2022). Nous avons ainsi pu établir pour chacun des groupes: 1. les proportions de lapereaux répondant au SC à la concentration d'apprentissage de celui-ci, afin d'évaluer jusqu'à quel niveau de concentration un SC était apprenable ; et 2. la distribution des proportions de lapereaux répondant au SC à d'autres concentrations situées en amont ou en aval de la concentration du SC, ceci afin de déterminer la gamme de perception du signal appris. Les résultats ont montré des performances olfactives exceptionnelles chez le lapin nouveau-né, fortement modulées par la concentration de conditionnement. Le caractère systématique et étendu des tests comportementaux réalisés, la reproductibilité et la cohérence des réponses obtenues, ainsi que les concentrations utilisées, concourent à apporter des connaissances inédites et inattendues dans le domaine de la perception olfactive chez un mammifère, et ce, juste après à la naissance. Ces données font l'objet d'un article proposé à iScience (Coureaud, Hjeij et al., en révision).

## *2. Matériels et Méthodes*

### *2.1. Animaux*

Les animaux étaient hébergés de la même manière que décrit dans l'étude I (section 2.2.1) si ce n'est que les lapins pour cette étude provenaient de l'animalerie du Centre de Recherche en Neurosciences de Lyon (CRNL, Bron, France). 329 lapereaux provenant de 93 portées ont constitué nos effectifs (5 lapereaux maximum étaient utilisés au sein d'une même portée pour constituer un groupe donné, ceci afin de réduire les risques d'« effet portée »). Toutes les expériences ont été réalisées conformément aux règles éthiques imposées par la loi française et approuvées par les comités d'éthique pour l'expérimentation animale de l'Université Lyon 1 (CEEAA-42 et -55) et le Ministère français de l'enseignement supérieur et de la recherche (no. APAFIS #27874-2020110416356847 v2).

## 2.2. Odorants

Le stimulus inconditionnel était la phéromone mammaire (PM; 2-méthyl-2-buténal ; CAS# 497-03-0) et les stimuli conditionnés l'isobutyrate d'éthyle (odorant A ; CAS# 97-62-1) et l'éthyl maltol (odorant B ; CAS# 4940-11-8) (Sigma-Aldrich ; Saint-Quentin-Fallavier, France). Comme dit plus haut, les odorants A et B ont été choisis pour leurs volatilités, opposées, permettant de tester ce qu'il en était des processus étudiés avec des odorants très différents de l'espace olfactif, mais aussi pour leur propriétés, précédemment démontrées, à susciter lorsque mis simultanément en mélanges, des perceptions synthétiques ou analytiques chez différentes espèces, dont les lapins nouveau-nés (cf. Introduction générale, section B.2).

Au cours du conditionnement, la PM était présentée dans le mélange à une concentration fixe de  $10^{-5}$  g/ml (concentration réactogène pour les lapereaux, induisant fortement leur comportement de recherche-saisie orale). Pour chaque groupe, la PM était mélangée avec une concentration décroissante de l'odorant A allant de  $10^{-2}$  à  $10^{-23}$  g/ml, ou une concentration décroissante de l'odorant B allant de  $10^{-2}$  à  $10^{-22}$  g/ml. Toutes les solutions ont été obtenues par dilutions successives dans l'eau distillée, réalisées avec des pas de 10 ou de 100 à partir d'une solution stock à  $10^{-2}$  g/ml. Cette dernière avait été préalablement préparée dans de l'eau distillée et 0,1% d'éthanol (anhydrous, Labelians, Nemours, France) ; cette concentration d'alcool ne provoquait, en elle-même, aucune réponse comportementale (Coureaud et al., 2008).

Conformément à l'historique de la littérature expérimentale relative au lapereau, les concentrations de solutions utilisées ici sont exprimées en g/ml. Cependant, afin de les rendre également comparables avec d'autres études de la littérature, les concentrations ont aussi été estimées en phase gazeuse, et sont parfois exprimées ci-après en mol/l. Ces calculs ont été réalisés selon EPI suite<sup>TM</sup> (Estimation Programs Interface Suite), en appliquant une équation avec la constante de Henry ( $\text{Pa}\cdot\text{m}^3/\text{mol}$ ), la température (k), et la constante des gaz parfait ( $\text{m}^3\cdot\text{Pa}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$ ). Les étapes de l'équation avec un exemple de conversion de l'odorant A de  $10^{-5}$  g/ml (liquide) en mol/l (gaz) sont données ci-dessous :

1. Conversion de la concentration en phase liquide de g/ml en g/L **en multipliant par 1000**:  
 $10^{-5} \times 1000 = 10^{-2}$  g/L
2. Conversion de la concentration de g/L à mol/l à partir de la masse molaire :  
 $C(\text{g/L})/M(\text{g/mol})$  ex.  $(10^{-2}/116.16) = 8,61 \times 10^{-5}$  mol/l

3. Conversion de la concentration de mol/l au mol/m<sup>3</sup> **en multipliant par 1000**, par ex.  $(8,61 \times 10^{-5}) \times 1000 = 8,61 \times 10^{-2} \text{ mol/m}^3$
4. Recherche de la **constante de Henry sur la plateforme EPI suite** : 118,2 Pa.m<sup>3</sup>/mol
5. Calcul de la pression partielle estimée à partir de la constante de Henry:  $C(\text{mol/m}^3) \times H(\text{Pa}\cdot\text{m}^3/\text{mol})$ , ici par ex.  $(8,61 \times 10^{-2}) \times 118,2 = 10,18 \text{ Pa}$
6. Calcul de la concentration en gaz estimée en mol/m<sup>3</sup> à partir de la température et de la constante de gaz parfait :  $P(\text{Pa})/R(\text{m}^3\cdot\text{Pa}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}) \times T(\text{K})$  ex.  $10,18/(8,314 \times 273+25) = 4,11 \times 10^{-3} \text{ mol/m}^3$
7. Conversion de la concentration en gaz estimée de mol/m<sup>3</sup> en mol/l **en divisant par 1000**, par ex.  $(4,11 \times 10^{-3})/1000 = 4,11 \times 10^{-6} \text{ mol/l}$

Pour transformer les valeurs obtenues en **ppm, ppb ou ppt**, les concentrations gazeuses en mol/l sont **multipliées par 22,4 L/mol** (volume molaire d'un gaz parfait), puis par **10<sup>6</sup>, 10<sup>9</sup> ou 10<sup>12</sup>**, respectivement.

### 2.3. Conditionnement

Le conditionnement olfactif se déroulait comme décrit précédemment (section D3.1 de l'introduction générale). Il avait lieu dans la salle d'expérimentation de l'équipe, immédiatement adjacente à celle d'hébergement des animaux, au sein de l'animalerie du CRNL, 1h environ avant l'allaitement quotidien afin d'homogénéiser l'état prandial et motivationnel des animaux (Coureaud et al., 2006 ; Montigny et al., 2006). Les lapereaux âgés de 2 à 3 jours (J2-J3) d'un même nid étaient transférés dans la salle expérimentale par groupe de 5, dans une bassine à température ambiante dont le fond était recouvert de papier absorbant. Le conditionnement était effectué par présentation unique et brève (5 min), 2 cm au-dessus de la portée, d'un gant en coton (19 x 14 cm) imbibé à l'aide d'une pipette de 8 ml de solution A+PM ou B + PM (e.g., Coureaud et al., 2006, 2014, 2020, 2022; Schneider et al., 2016; Jouhanneau et al., 2016). Vingt lapereaux en moyenne, de 4 portées différentes, étaient conditionnés au sein d'un groupe donné. Chaque groupe de 20 était ensuite divisé en deux sous-groupes de 10 individus pour les tests comportementaux, afin d'exposer chaque sous-groupe à une gamme complémentaire de concentrations (tester chaque lapereau à l'ensemble de la gamme risquait d'occasionner des effets de fatigue et de saturation olfactive, ce que nous souhaitons donc éviter). Au total, 176 et 153 lapereaux ont ainsi été conditionnés à l'odorant A (9 groupes :  $n = 19,7 \pm 4,9$ ) et à l'odorant B (8

groupes :  $n = 19,1 \pm 3,5$ ), respectivement. Deux minutes après l'arrêt du conditionnement, les nouveau-nés étaient individuellement marqués à l'aide d'un marqueur peu odorant, puis réintroduits au chaud dans leur nid. Toutes les bassines utilisées pour transporter et/ou conditionner les lapereaux étaient nettoyées à l'alcool et à l'eau après chaque utilisation.

#### *2.4. Tests comportementaux*

Les lapereaux étaient testés comportementalement le lendemain du conditionnement, dans la même salle d'expérimentation qu'utilisée pour celui-ci, 1h avant l'allaitement quotidien. Le principe consistait à maintenir chaque lapereau individuellement, dans une main gantée (vinyl) de l'expérimentateur, tout en gardant sa tête libre de mouvement. L'autre main amenait une baguette de verre imbibée d'une des solutions de SC (une baguette différente était utilisée par concentration) ou de la solution de PM (baguette exclusivement utilisée pour la phéromone afin d'éviter toute contamination du SC) 0,5 cm devant les narines du lapereau, durant 10 sec maximum. Le test était positif si les lapereaux exprimaient le comportement typique de recherche et/ou recherche-saisie orale de la baguette, négatif si la présentation n'induisait que du flairage. En cas de réponse positive, le nez des lapereaux était délicatement séché avec un papier absorbant, avant toute présentation d'un autre stimulus. Les 20 lapins d'un même groupe, donc exposés à la même concentration de SC durant l'apprentissage, étaient divisés en deux sous-groupe de 10 au moment du test de rétention, chaque sous-groupe étant testé 5 par 5 à 5 ou 6 concentrations de SC maximum dans un ordre aléatoire. L'ordre de présentation des stimuli était systématiquement contrebalancé d'un lapereau à l'autre, sauf pour la concentration à laquelle le SC avait été appris qui était toujours testée à la fin (contrôle positif 1 permettant de s'assurer que les lapereaux avaient bien appris le SC, ou pas), avant qu'une présentation finale de PM constitue un contrôle positif 2 (permettant de s'assurer que la non réponse de certains lapereaux au SC n'était pas liée à une fatigue générale, sensorielle ou physique). Après la fin de passation de 5 premiers lapereaux, ceux-ci étaient immédiatement remis au chaud dans leur nid. Les bassines et baguettes étaient nettoyées à l'alcool et à l'eau après chaque séance d'expérimentation (ou dès que nécessaire si certains lapereaux urinaient dans la bassine par exemple).



## 2.5. Analyses statistiques

L'objet étant de comparer les proportions de lapereaux répondant aux concentrations présentées de SC, le type d'analyse différait selon que les données étaient dépendantes, i.e., réponses de lapereaux appartenant au même sous-groupe testés à différentes concentrations, ou que les données étaient indépendantes, i.e., lapereaux de sous-groupes/groupes différents testés à de mêmes concentrations. Pour les données dépendantes, les comparaisons étaient effectuées via le test Q de Cochran et, si le test était significatif, l'analyse était poursuivie avec le test de McNemar afin de comparer les groupes 2 à 2. Pour les données indépendantes, les comparaisons étaient faites via le test du  $\chi^2$  de Pearson (comparaison globale puis 2 x 2). Les données étaient considérées comme significatives lorsque les tests fournissaient une p-value < 0,05. Les analyses furent réalisées avec XLSTAT (Microsoft, Redmond, USA). Le tableau donné en Annexe 8 fournit le détail de toutes les comparaisons statistiques.

## 3. Résultats

### 3.1. Réponses des lapereaux à la concentration du SC utilisée durant le conditionnement

Les résultats (Figure 32) illustrent la distribution de proportions de lapins nouveau-nés réactifs au SC à la concentration apprise, comprise entre  $10^{-5}$  à  $10^{-23}$  g/ml pour l'odorant A, et entre  $10^{-5}$  à  $10^{-22}$  g/ml pour l'odorant B.

Pour l'odorant A, les lapereaux ont significativement et similairement répondu, avec une proportion allant de 77-100%; lorsque la concentration de A utilisée durant l'apprentissage était comprise entre  $10^{-5}$  et  $10^{-22}$  ( $\chi^2 = 9,1$ ; ddl = 7 ; p = 0,24). Les proportions de répondants étaient alors aussi fortes que celles exprimées envers la PM (>89%: comparaisons 2 x 2 pour A vs. PM :  $\chi^2 < 0,5$  ; p > 0,24). En revanche, les lapereaux ont brutalement cessé de répondre à A (0%) lorsque l'odorant était conditionné à  $10^{-23}$  g/ml (comparaisons 2 x 2 entre les concentrations précédentes et  $10^{-23}$  g/ml :  $\chi^2 > 20,49$  ; ddl = 1 ; p < 0,0001) (Figure 32 haut). Pour l'odorant B, l'apprentissage engendrait de fortes, et similaires, proportions de répondants (> 65%) lorsque l'odorant était conditionné entre  $10^{-5}$  et  $10^{-21}$  g/ml ( $\chi^2 = 6,6$  ; ddl = 6 ; p = 0,35). Le taux de répondants était alors aussi fort que le taux obtenu pour la PM (comparaisons 2 x 2 pour B vs. PM :  $\chi^2 < 3,2$  ; p < 0,074 et >95%). Ce taux se réduisait considérablement (0%) lorsque l'odorant B était conditionné à  $10^{-22}$  g/ml (comparaisons 2 x 2 entre les concentrations précédentes et  $10^{-22}$  g/ml :  $\chi^2 > 15,51$ ; ddl = 1 ; p < 0,0001) (Figure 32 bas).

Au final, ces résultats conduisaient donc à penser que **le seuil de détection-perception spontanée** chez les lapereaux nouveau-nés était de  $10^{-22}$  g/ml pour l'odorant A et de  $10^{-21}$  g/ml pour l'odorant B, puisqu'en-dessous de ces concentrations la PM ne permettait plus de faire apprendre le SC pourtant combiné en mélange avec elle.

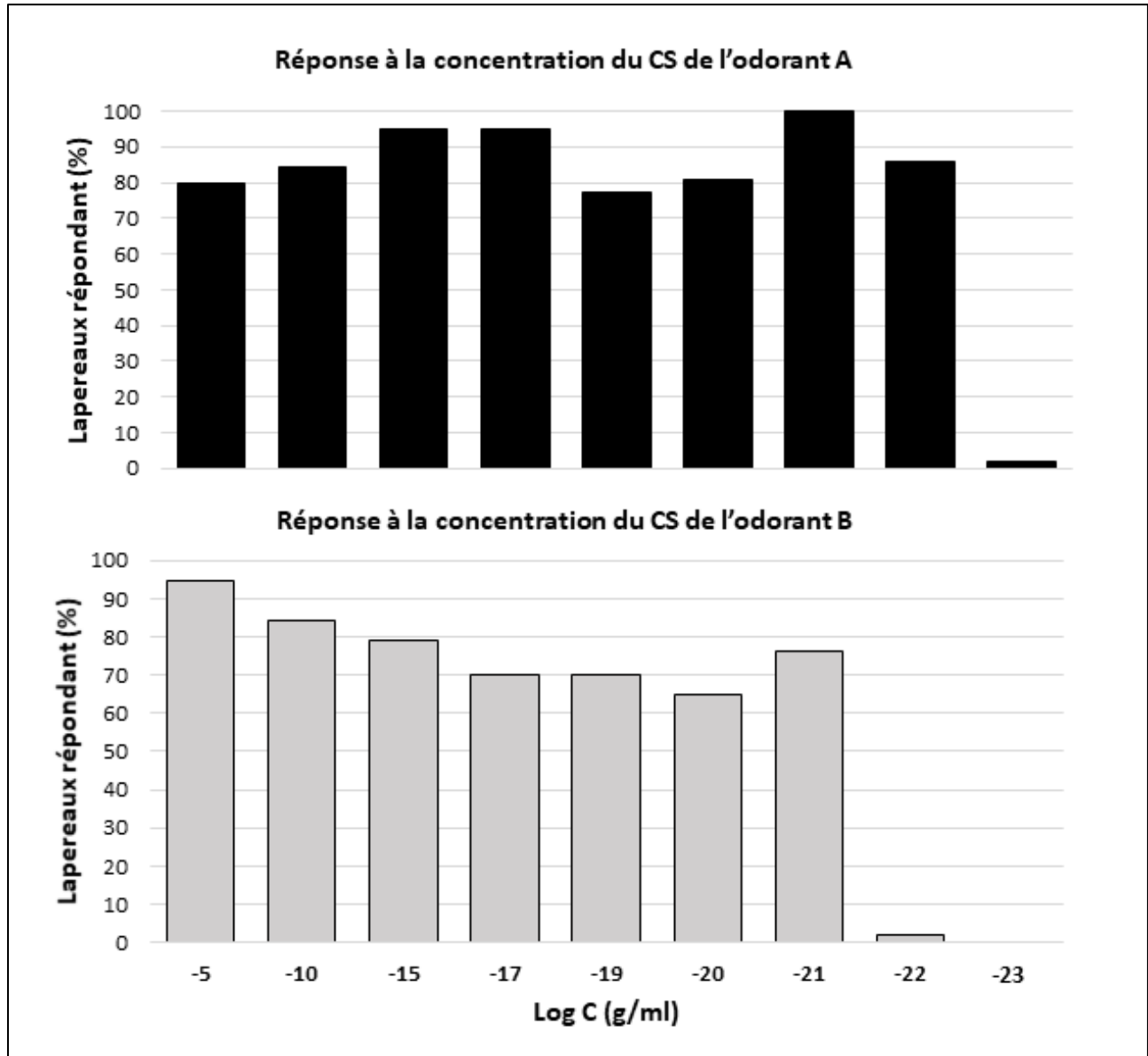


Figure 32: Proportions de lapins nouveau-nés répondant par le comportement typique de recherche-saisie orale au stimulus conditionné présenté à la concentration utilisée lors du conditionnement (odorant A: barres noires, odorant B: barres grises). Chaque barre correspond à un groupe différent, conditionné à la concentration de SC mentionnée en abscisse (n = 20 lapereaux par groupe).

Des essais de conditionnement ont également été réalisés à des concentrations supérieures à  $10^{-5}$  g/ml, pour A comme pour B, en l'occurrence à  $10^{-2}$  (n=5 lapereaux par odorant, provenant d'une seule portée) et  $10^{-3}$  g/ml (n=10 lapereaux par odorant, issus de 2 portées différentes). Il est apparu qu'à ces deux concentrations, la PM ne permettait pas d'engendrer d'apprentissage, ni pour A ni pour B (0% de répondants). Cet échec d'apprentissage ne pouvait pas être lié à l'incapacité des lapereaux à détecter les odorants, vu le haut niveau d'intensité de ces derniers. Par contre, il était envisageable que cela découle du fait que les concentrations aient été trop fortes et qu'elles masquaient la PM lors du conditionnement. Pour tester cette hypothèse, nous avons observé la réactivité de lapereaux naïfs (non conditionnés) aux mélanges SC  $10^{-2}$  + PM et SC  $10^{-3}$  + PM, avec comme SC l'odorant A ou l'odorant B (n = 10 lapereaux par odorant, provenant de 3 portées différentes). Aucune réponse n'est apparue envers A+PM que ce soit à  $10^{-2}$  et  $10^{-3}$  g/ml. A ces concentrations, la PM n'était donc pas perçue par les lapereaux et, du coup, elle ne pouvait jouer ni son rôle de déclencheur de comportement, ni son rôle de renforçateur. En ce qui concerne les mélanges PM + B  $10^{-2}$  et PM + B  $10^{-3}$  g/ml, 90% et 100% des lapereaux ont répondu, respectivement. Dans ce cas, il n'y avait donc pas de masquage de la PM par l'odorant.

### *3.2. Gamme de concentrations réactogènes des odorants après apprentissage*

La distribution des proportions de lapereaux répondant aux différentes concentrations du SC est présentée Figure 33 pour l'odorant A et Figure 34 pour l'odorant B. Le détail des analyses statistiques associées est donné en Annexe 7.

Les conditionnements réalisés avec l'odorant A à  $10^{-5}$  g/ml et  $10^{-10}$  g/ml (Figure 33) ont conduit à une réactivité élevée et constante des lapereaux sur une gamme de concentrations très large, allant de  $10^{-5}$  à  $10^{-18}$  g/ml ( $\geq 60\%$ ), et de  $10^{-5}$  à  $10^{-21}$  g/ml ( $\geq 50\%$ ). Pour les concentrations inférieures à ces gammes, la réactivité diminuait drastiquement ( $\leq 22\%$ ). A partir des concentrations de conditionnement  $10^{-15}$  et  $10^{-17}$  g/ml, les lapereaux cessaient de réagir aux concentrations les plus élevées, c'est-à-dire allant de  $10^{-5}$  à  $10^{-10}$  g/ml, et de  $10^{-5}$  à  $10^{-15}$  g/ml, respectivement. De plus, après conditionnement à  $10^{-15}$  g/ml, la gamme de concentrations réactogène devenait limitée, restreinte à  $10^{-15}$  à  $10^{-18}$  g/ml (SC  $\geq 80\%$  de répondants). De même, après conditionnement à  $10^{-17}$  g/ml, la gamme réactogène allait de  $10^{-16}$  à  $10^{-21}$  g/ml (SC  $\geq 67\%$  de répondants). En diminuant plus avant les concentrations d'apprentissage du SC, la réactivité des lapereaux se resserrait encore plus autour de la concentration de conditionnement. Par exemple, après conditionnement à  $10^{-19}$  ou  $10^{-20}$  g/ml, la réactivité la plus élevée observée

( $\geq 75\%$  dans le premier cas, et  $\geq 60\%$  dans le second) se situait entre  $10^{-18}$  et  $10^{-22}$  g/ml, et  $10^{-19}$  et  $10^{-24}$  g/ml, respectivement ; au-dessus ou en dessous de ces concentrations, la proportion de lapereaux répondant ( $\leq 42\%$ ) n'était plus significative.

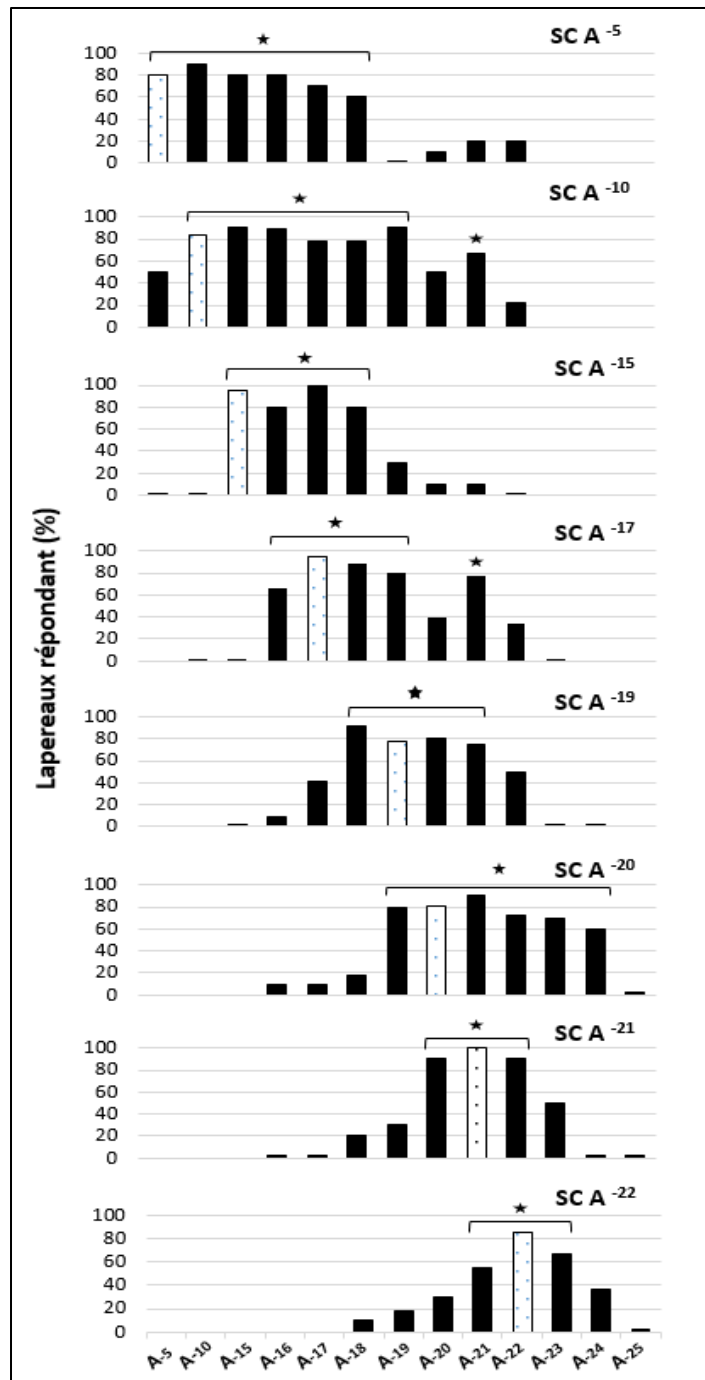


Figure 33: Proportions de lapereaux répondant (en ordonnées) en fonction de la concentration testée de l'odorant A conditionné (en abscisse), pour chacune des concentrations de A associées à la PM (SC A-5 à -22 g/ml). Au sein de chaque histogramme la barre la plus claire signale la proportion de répondants à la concentration apprise du SC. L'astérisque signale une différence significative d'avec le reste des concentrations testées ( $p \leq 0,05$ ).

Enfin, pour les concentrations de conditionnements les plus faibles, à savoir  $10^{-21}$  et  $10^{-22}$  g/ml, la gamme déclenchant une réactivité soutenue chez les lapereaux était étroitement centrée autour de la concentration utilisée pour l'apprentissage du SC lors du conditionnement, c'est-à-dire bornée entre  $10^{-20}$  et  $10^{-22}$  g/ml ( $\geq 90\%$ ) et  $10^{-21}$  et  $10^{-23}$  g/ml (55-86%), respectivement.

Pour l'odorant B, nous avons observé la même tendance globale que pour A (Figure 34), avec une légère différence de dynamique de concentrations. Ainsi, après conditionnement à  $10^{-5}$  g/ml, la réactivité des nouveau-nés était élevée ( $\geq 80\%$ ) sur une gamme de concentrations large, allant de  $10^{-5}$  à  $10^{-19}$  g/ml ; elle diminuait ensuite fortement à partir de  $10^{-20}$  g/ml (22%) et s'annulait en dessous. Après conditionnements à  $10^{-10}$  et  $10^{-15}$  g/ml, les lapereaux montraient une forte réactivité sur une plage de concentrations plus centrée sur les concentrations les plus élevées, allant de  $10^{-5}$  à  $10^{-15}$  g/ml ( $\geq 84\%$ ) et de  $10^{-5}$  à  $10^{-16}$  g/ml ( $\geq 70\%$ ), respectivement, tandis que la réactivité devenait faible ( $\leq 30\%$ ) aux concentrations plus basses. A partir de la concentration  $10^{-17}$  g/ml de SC appris, les nouveau-nés ne répondaient plus à  $10^{-5}$  et à  $10^{-10}$  g/ml. Leur gamme de réponse demeurait néanmoins encore très étendue, allant de  $10^{-15}$  jusqu'à  $10^{-21}$  g/ml (proportions de répondant comprises entre 40 et 70%). À partir du conditionnement à  $10^{-19}$  g/ml, la réactivité des lapereaux devenait de plus en plus étroite, limitée à la concentration d'apprentissage ou à des niveaux très adjacents. Ainsi, après conditionnement à  $10^{-19}$  et  $10^{-20}$  g/ml, les lapereaux réagissaient significativement aux concentrations allant de  $10^{-18}$  à  $10^{-21}$  g/ml (40-70 %) et à  $10^{-17}$ ,  $10^{-19}$ ,  $10^{-21}$  g/ml (40-65 %), respectivement. Après conditionnement à  $10^{-21}$  g/ml, la gamme de réactivité se limitait à  $10^{-20}$  et  $10^{-21}$  g/ml (64-76%).

Les résultats illustrent clairement que la distribution des proportions de lapereaux répondant le long de l'axe des concentrations change selon la concentration apprise du SC, que celui-ci soit l'odorant A ou l'odorant B. Ainsi, une différence s'observe après conditionnement au SC à fortes concentrations et, également, à faibles concentrations. Après conditionnement aux SC les plus forts, c'est-à-dire  $10^{-5}/10^{-10}$  g/ml pour A et  $10^{-5}$  g/ml pour B, un étalement de la perception qualitative du SC s'observe sur une gamme de concentrations allant jusqu'à 17 et 15 unités logarithmiques, respectivement, avec des seuils de détection-reconnaissance particulièrement bas ( $10^{-18}$  et  $10^{-21}$  g/ml pour A avec SC  $10^{-5}$  et  $10^{-10}$  g/ml, respectivement, et  $10^{-19}$  g/ml pour B avec SC  $10^{-5}$  g/ml).

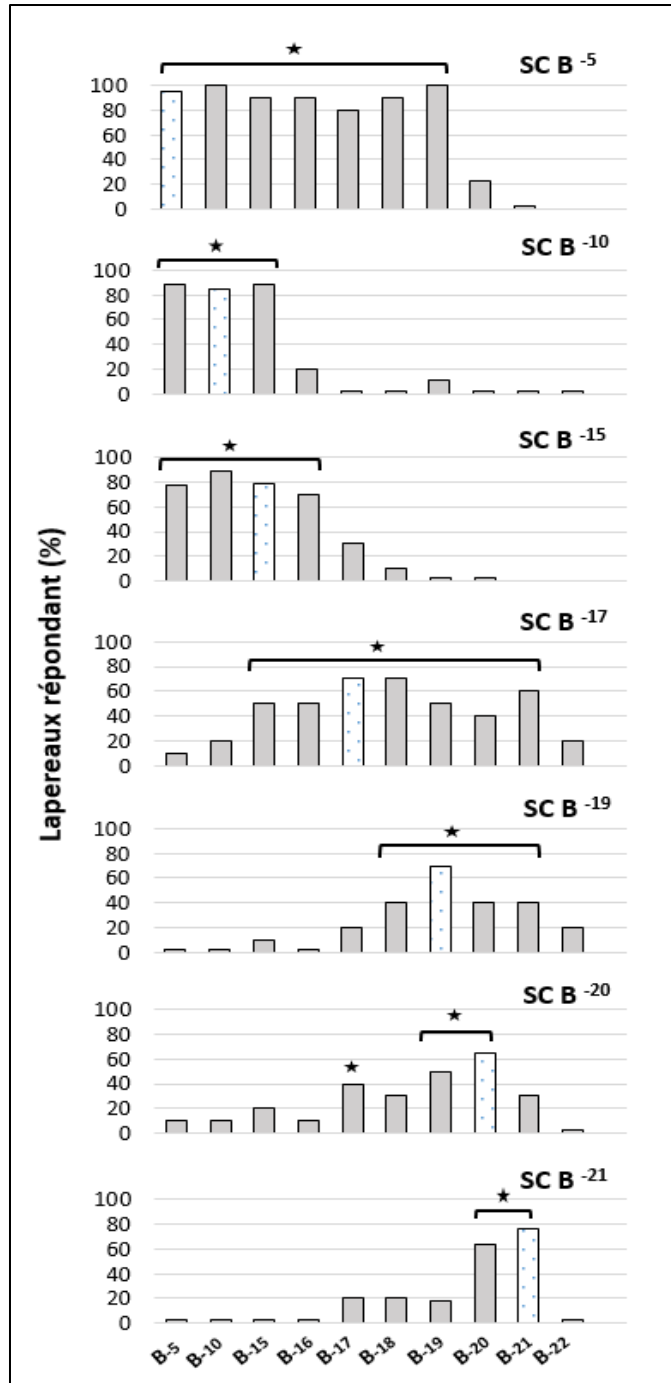


Figure 34: Proportions de lapereaux répondant (en ordonnées) en fonction de la concentration testée du stimulus conditionné, ici l'odorant B (en abscisse), pour chacune des concentrations de B associées avec la PM. Au sein de chaque histogramme, la barre la plus claire signale la proportion de répondants à la concentration apprise du SC. L'astérisque signale une différence significative avec le reste des concentrations testées ( $p \leq 0,05$ ).

Pour les conditionnements impliquant des concentrations de SC inférieures (à celles mentionnées ci-dessus), la qualité olfactive de chacun des odorants paraît devenir en quelque sorte mouvante, et extrêmement dépendante de la concentration. Cela amène à proposer que **la limite qualitative perceptive spontanée** (définie dans le paragraphe suivant) des lapereaux se situe à  $10^{-10}$  g/ml pour l'odorant A, et  $10^{-15}$  g/ml pour l'odorant B. Par contre, le resserrement de la gamme de perception autour de la concentration du SC pour les conditionnements réalisés avec des SC faibles, s'accompagnait d'une diminution drastique du seuil de détection, atteignant  $10^{-23}$  g/ml pour A et  $10^{-21}$  g/ml pour B. Ces seuils constituent ainsi **le seuil de détection-perception absolue**. Prises ensemble, ces données illustrent les capacités extrêmes de détection olfactive des lapereaux à la naissance, exprimées 24h post-apprentissage induit par la PM.

### *3.3. Impact de la volatilité des odorants sur leur gamme de perception*

Les valeurs exprimées dans les Figures 32-34 représentent la concentration des odorants en phase liquide. En réalité, les lapereaux percevaient l'odeur de chaque composé dans l'espace gazeux présent autour de la baguette de verre. Afin de comparer de façon plus réaliste chimiquement, et aussi précisément que possible, la sensibilité des lapereaux envers les odorants A et B, nous avons calculé leurs concentrations en phase gazeuse (exprimées en mol/l, cf. calcul dans la section 2 des matériels et méthode de l'étude). Eu égard à leur propriété de volatilité, illustrée par leur pression de vapeur saturante,  $3,23 \times 10^3$  Pa pour A et  $1,93 \times 10^{-2}$  Pa pour B, l'odorant A est environ 167 000 fois plus concentré que l'odorant B, à même concentration en phase liquide. Comme indiqué dans le Tableau 6, la plage de concentrations allant de  $10^{-2}$  à  $10^{-24}$  g/ml en phase liquide correspond donc à une gamme en phase gazeuse allant de  $4,11 \times 10^{-3}$  à  $4,11 \times 10^{-25}$  mol/l pour A, et de  $3,23 \times 10^{-9}$  à  $3,23 \times 10^{-31}$  mol/l pour B.



Tableau 6: Estimation des correspondances entre concentrations en g/ml (phase liquide) et mol/l (phase gazeuse) pour les odorants A et B. Les valeurs de la constante de Henry utilisées pour A et B étaient respectivement de  $1,18 \times 10^2$  et  $1,12 \times 10^4$  pa/m<sup>3</sup>/mol (cf. Matériel et Méthodes).

Log (g/ml)	A (mol/l)	B (mol/l)
$10^{-2}$	$4,11 \times 10^{-3}$	$3,22 \times 10^{-9}$
$10^{-3}$	$4,11 \times 10^{-4}$	$3,22 \times 10^{-10}$
$10^{-5}$	$4,11 \times 10^{-6}$	$3,22 \times 10^{-12}$
$10^{-10}$	$4,11 \times 10^{-11}$	$3,22 \times 10^{-17}$
$10^{-15}$	$4,11 \times 10^{-16}$	$3,22 \times 10^{-22}$
$10^{-17}$	$4,11 \times 10^{-18}$	$3,22 \times 10^{-24}$
$10^{-19}$	$4,11 \times 10^{-20}$	$3,22 \times 10^{-26}$
$10^{-20}$	$4,11 \times 10^{-21}$	$3,22 \times 10^{-27}$
$10^{-21}$	$4,11 \times 10^{-22}$	$3,22 \times 10^{-28}$
$10^{-22}$	$4,11 \times 10^{-23}$	$3,22 \times 10^{-29}$
$10^{-23}$	$4,11 \times 10^{-24}$	$3,22 \times 10^{-30}$
$10^{-24}$	$4,11 \times 10^{-25}$	$3,22 \times 10^{-31}$

En se basant sur les résultats obtenus dans la section 3.1 et 3.2 de notre étude II et sur les calculs de concentrations en phases gazeuse, trois jalons émergent comme étant caractéristiques des odorants choisis et des gammes de concentration dans lesquelles le système olfactif des lapins nouveau-nés paraît fonctionner (Figure 35) :

- 1- **Le seuil de détection-perception spontanée** (flèches grises dans la Figure 35): il correspond à la plus basse concentration de chaque odorant pouvant être apprise par association avec la PM:  $4,11 \times 10^{-23}$  mol/l pour A ( $10^{-22}$  g/ml), et  $3,23 \times 10^{-28}$  mol/l pour B ( $10^{-21}$  g/ml).
- 2- **La limite qualitative perceptive** (flèches blanches): il s'agit de la concentration apprise en dessous de laquelle la qualité apprise de l'odorant perd sa stabilité, et devient particulièrement dépendante de la concentration de conditionnement. Elle correspond à environ  $4,11 \times 10^{-11}$  mol/l pour l'odorant A ( $10^{-10}$  g/ml), et à  $3,23 \times 10^{-22}$  mol/l pour l'odorant B ( $10^{-15}$  g/ml).

- 3- **Le seuil de détection-perception absolue post-conditionnement** (flèches noires) : il désigne la plus basse concentration du SC détectable après conditionnement, donc étant observée après apprentissage aux concentrations les plus faibles. Ce seuil correspond à environ  $4,11 \times 10^{-24}$  mol/l pour l'odorant A ( $10^{-23}$  g/ml), et à  $3,23 \times 10^{-29}$  mol/l pour l'odorant B ( $10^{-21}$  g/ml).

Ainsi, ces trois jalons de concentrations pointent une gamme allant vers des valeurs de concentrations plus basses pour l'odorant B que pour l'odorant A, tout en sachant que du fait de la faible volatilité de B, la gamme d'activité de cet odorant sur le comportement est plus restreinte.

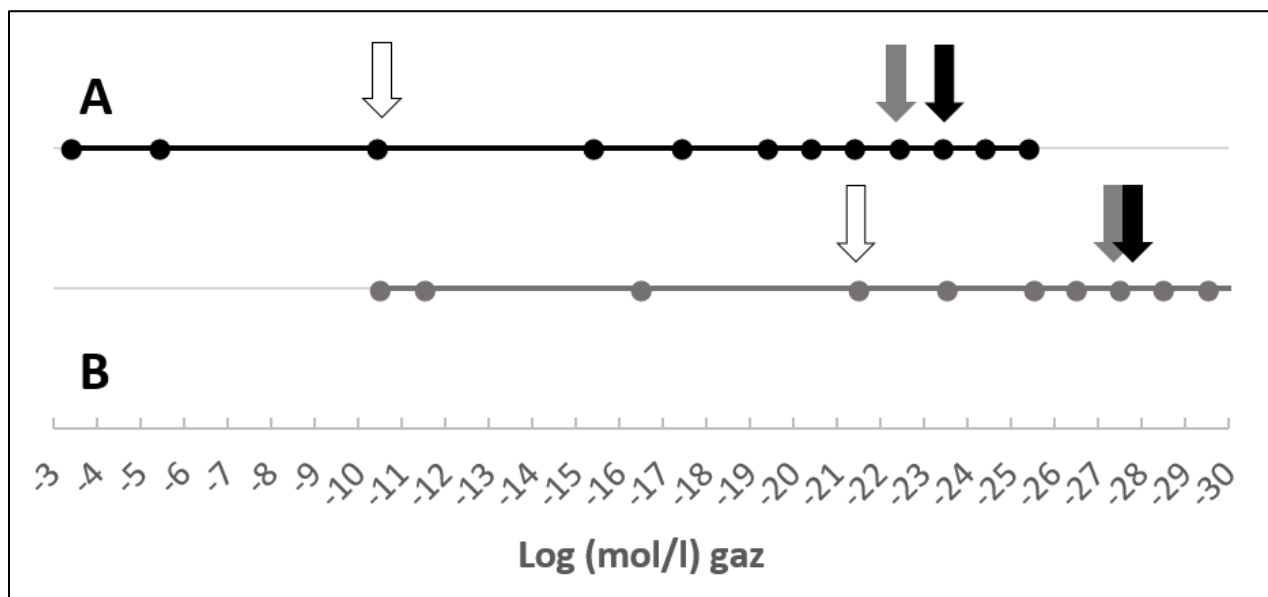


Figure 35: Seuil de perception spontanée (flèches blanches), limite qualitative perceptuelle (flèches grises) et seuil de détection-perception absolue (flèches noires) post-conditionnement observés pour l'odorant A (en haut) ou l'odorant B (au milieu).

#### 4. Discussion partielle

Dans cette étude, nous avons tout d'abord évalué la gamme de concentrations pour laquelle l'apprentissage PM-induit d'un SC était possible chez les lapereaux, en choisissant volontairement d'étudier ce qu'il en était avec deux odorants de volatilités opposées, utilisés dans une large gamme de concentration ( $10^{-2}$  -  $10^{-23}$  g/ml). Les résultats ont montré que les lapins nouveau-nés sont spontanément aptes à détecter et apprendre chacun des deux odorants, A comme B, dans une gamme extrêmement large de concentrations (de  $10^{17}$  et  $10^{16}$  unités logarithmiques, respectivement), incluant des concentrations spectaculairement faibles

(<  $10^{-18}$  g/ml). La plus basse concentration détectée induisant un apprentissage, qui constitue **le seuil de détection-perception spontanée** des lapereaux, était de  $10^{-21}$  g/ml pour B, et encore un peu en-deçà pour A:  $10^{-22}$  g/ml. Après transformation en mol/l, les seuils de détection spontanés en phase gazeuse peuvent être estimés à  $4,11 \times 10^{-23}$  mol/l ( $9,2 \times 10^{-7}$  ppq (v/v)) pour l'odorant A, et  $3,22 \times 10^{-28}$  mol/l ( $7,23 \times 10^{-12}$  ppq (v/v)) pour l'odorant B (Tableau 6). Le seuil de détection spontanée de A paraît alors très proche de celui du bombykol, molécule agissant comme phéromone sexuelle chez le mâle Bombyx du mûrier (*Bombyx Mori*), qui a été estimé à  $2,8 \times 10^{-22}$  mol/l ( $6,32 \times 10^{-6}$  ppq (v/v)) (Tabuchi et al., 2013). Jusqu'alors, il s'agissait à notre connaissance du seuil le plus bas rapporté dans la littérature pour une odeur, non apprise, active comportementalement. Les seuils observés avec A et B chez le lapereau seraient donc encore plus bas. Ceci pointe l'efficacité exceptionnelle du système olfactif du lapin nouveau-né, lui permettant de détecter et d'apprendre un odorant nouveau par couplage perceptif avec la PM.

Nous avons également trouvé que les concentrations  $\geq 10^{-3}$  g/ml n'étaient pas apprenables par les lapereaux par association avec la PM, dans nos conditions expérimentales. Afin d'établir si l'incapacité d'apprendre les concentrations plus fortes provenait d'un masquage de la PM dans le mélange PM+odorant lors du conditionnement, nous avons testé la réponse des lapereaux à la PM dans le mélange. Les lapereaux percevait la PM avec l'odorant B mais pas avec A. Cela peut s'expliquer par le fait que B, en phase gazeuse, présente une concentration 100 000 fois plus faible que A : pour B les concentrations à  $10^{-2}$  et  $10^{-3}$  g/ml sont respectivement de  $3,22 \times 10^{-9}$  et  $3,22 \times 10^{-10}$  mol/l, alors que pour A elles sont de  $4,11 \times 10^{-3}$  et  $4,11 \times 10^{-4}$  mol/l (Tableau 6, expliqué en section 3.3). Si B n'est pas en mesure de masquer la PM eu égard à sa concentration, B à  $10^{-2}$  et  $10^{-3}$  g/ml se trouve en solution avec un pourcentage d'alcool de respectivement 0,1 et 0,01 %, (comme dans la solution mère de  $10^{-2}$ ) ; de fait, il est probable que ce soit l'éthanol qui, du fait de la faible volatilité de B, masque la perception de B dans le mélange B + PM et empêche son apprentissage.

Dans un deuxième temps, nous avons cherché à déterminer les gammes de concentrations auxquelles les lapereaux répondaient après apprentissage de A et de B à des concentrations distinctes. Les résultats illustrent clairement que la distribution des réponses le long de l'axe des concentrations change selon la concentration apprise du SC. En effet, lorsque l'apprentissage impliquait une des concentrations de SC les plus fortes, les animaux montraient une aptitude

importante à la « généralisation qualitative » en répondant alors sur une large gamme de concentrations (estimée à 17 et 15 unités logarithmiques, respectivement pour A et B). La généralisation est un processus cognitif permettant de percevoir des stimuli comme étant suffisamment proches qualitativement pour que l'individu y réponde similairement (Shepard, 1987). Dans un gradient de généralisation, la réponse est maximale pour le stimulus appris et diminue systématiquement cependant que la dissimilarité du stimulus augmente, selon une distribution normale symétrique lorsque celui-ci s'éloigne du stimulus appris (Guttman, 1959; Guttman & Kalish, 1956) ; c'est ce que nous observons chez les lapereaux. Ce principe de généralisation a probablement une haute valeur adaptative, étant donné qu'en nature, dans le quotidien écologique des organismes, la concentration des sources en odeurs peut fortement varier (en fonction de l'alternance jour/nuit, des saisons, des conditions climatiques au sens large, du relief, de l'activité humaine, etc.). La gamme observée ici chez le lapereau pourrait donc correspondre à la gamme de fonctionnement usuel du système olfactif dans la vie quotidienne du lapereau, lui permettant de détecter et reconnaître des odeurs, du moins des odeurs apprises.

En dehors de cette gamme, lorsque l'animal était conditionné à apprendre des concentrations extrêmement basses, les résultats suggèrent que le système olfactif changeait de mode de fonctionnement, penchant vers une détection-reconnaissance très dépendante de la concentration, avec une réactivité comportementale resserrée sur la concentration apprise ou celles immédiatement voisines. Ce fonctionnement extrême était par ailleurs borné, du côté des plus faibles concentrations, par le **seuil de détection-perception absolue**, extrêmement bas chez le lapin nouveau-né dans nos conditions :  $10^{-21}$  g/ml pour l'odorant B et même  $10^{-23}$  g/ml pour l'odorant A. Ce mode de fonctionnement impliquait ainsi une rupture de la qualité olfactive du signal appris, rendant les lapereaux indifférents aux concentrations les plus fortes (concentrations n'étant plus reconnues comme qualitativement similaires à celle du SC appris). La concentration du SC au-dessous de laquelle la rupture de qualité apparaissait peut être définie comme **le seuil qualitatif perceptuel spontané** ( $10^{-15}$  g/ml pour l'odorant B et  $10^{-10}$  g/ml pour l'odorant A). Lorsque sont prises en compte les concentrations réelles des deux odorants A et B en phase gazeuse (en mol/l), la plage de concentrations pour laquelle le système olfactif était réactif au signal appris était plus étendue pour l'odorant A, tout en concernant des concentrations de niveau plus faible pour B. Cette observation suggère que le système olfactif du lapereau se serait adapté de façon à percevoir et détecter les odorants moins volatiles (Williams & Ringsdorf, 2020).

De façon congruente avec nos observations, la littérature rapporte que des chiens conditionnés à des concentrations décroissantes d'acétate d'isoamyle (odorant dont la volatilité est très proche de notre odorant A), ont des seuils de détection reflétant une augmentation de leur sensibilité à cet odorant (DeChant & Hall, 2021). Dans cette étude, les auteurs ont discuté leurs résultats en termes de généralisation de la perception olfactive, pour les concentrations faibles. Ils ont pour cela distingué les concentrations  $10^{-2}$ ,  $10^{-4}$  et  $10^{-5}$  v/v, d'acétate d'isoamyle diluées dans l'huile minérale (concentrations qui se situent, comparativement, parmi les plus fortes concentrations de notre étude, et qui couvrent une gamme bien plus réduite que la nôtre). Les chiens ainsi conditionnés présentaient un seuil de détection absolue de l'odorant de l'ordre de 1-2 ppt (Concha et al., 2019). D'après nos résultats, et en restant prudents quant à ce type de comparaison entre études portant sur des espèces distinctes, des individus d'âge différents, conditionnés et testés de façons différentes, la sensibilité des lapereaux pour une odeur apprise surpasserait celle des chiens. En effet le seuil de détection absolu de l'odorant A, post-conditionnement, était de  $10^{-23}$  g/ml chez nos nouveau-nés, c'est à dire de l'ordre de  $10^{-10}$  ppt ou  $10^{-9}$  ppq (v/v), celui de l'odorant B étant de  $10^{-21}$  g/ml, c'est-à-dire de l'ordre de  $10^{-14}$  ppt ou  $10^{-11}$  ppq (v/v). De la même manière, les lapereaux semblent plus sensibles aux odorants A et B que les souris adultes ne le sont au bourgeonal, dont le seuil de détection absolu ( $10^{-1}$  ppq) est pourtant, à notre connaissance, le plus bas rencontré à ce jour dans la littérature envers un stimulus appris chez un mammifère (Larsson & Laska, 2011).

Cette sensibilité extrême et inattendue des lapins nouveau-nés, eu égard à la littérature existante à ce jour, pourrait reposer pour partie sur le fait que le stimulus utilisé ici comme renforçateur, la PM, est une phéromone à très haute fonction biologique, vitale à cet âge pour permettre une prise lactée efficace lors de l'unique et brève visite quotidienne de la mère. Le fait que les conditionnements et les tests de rétention aient été réalisés à jeun, optimisait d'ailleurs sans doute la réactivité des nouveau-nés à la PM et au stimulus associé, ces derniers étant dans un état attentionnel optimal pour répondre à toute information olfactive d'intérêt pour leur succès de têter. L'apprentissage PM-induit est d'ailleurs connu pour impacter favorablement la tétée : un odorant appris un jour donné par couplage avec la PM (hors nid ou durant un allaitement sous la mère) confère un avantage en termes de succès de tétée aux lapereaux qui le retrouve le lendemain sur les zones mammaires de la lapine venant au nid, contrairement à des lapereaux n'ayant pas appris

l'odeur en question ou étant exposés le lendemain à une odeur non familière ou à de l'eau (Jouhanneau et al., 2016).

Comme toute étude, la nôtre présente bien sûr certaines limites, l'une d'entre elles étant que les valeurs exprimées dans nos méthodes et résultats ne sont que des estimations. En effet, les concentrations rapportées n'ont pu qu'être calculées d'après les dilutions successives effectuées en phase liquide, puis estimées dans un second temps, également par calcul, en phase gazeuse. A ce jour, il n'existe en fait aucun outil technologique permettant de valider la concordance de ces calculs avec la réalité biologique *sensu stricto*, aucun appareil de mesure ne pouvant détecter des concentrations aussi basses. Ceci dit, il est important de rappeler que nos odorants ont été préparés et présentés dans des conditions strictement contrôlées et standardisées, et que les sessions successives de tests ont confirmé la reproductibilité des réponses des lapereaux aux différentes concentrations. De fait, tout en restant prudents quant à la précision exacte des valeurs estimées en phase gazeuse, il est frappant de noter que les concentrations auxquelles les lapereaux se sont révélés réactifs atteignent parfois des concentrations proches, voire inférieures au nombre d'Avogadro. Ainsi, lorsqu'après conditionnement les lapereaux répondent comportementalement à  $A \cdot 10^{-23}$  g/ml, soit  $4,11 \cdot 10^{-24}$  Mol/l, cela revient à répondre à 0,3 molécules/l. Pour B, lorsque les lapereaux réagissent à  $10^{-21}$  g/ml, soit  $3,23 \cdot 10^{-28}$  Mol/l, cela revient à répondre à 0,2 molécules/m<sup>3</sup>. Ces valeurs calculées, extrêmement faibles, sont proches de l'utilisation faite de certaines molécules en homéopathie, les dilutions du principe actif se réduisant régulièrement au nombre d'Avogadro, voire moins (Khuda-Bukhsh, 2003; Rajendran, 2015). Bien qu'il est pratiquement impossible de déterminer avec certitude les seuils de détection dans des conditions réelles, car cela dépend de nombreux facteurs tels que la qualité de l'air, la température, l'humidité, la présence d'autres composés odorants, etc., plusieurs données suggèrent que ces seuils peuvent correspondre à des concentrations extrêmement faibles. Nous pouvons donc légitimement nous demander quelle réalité mesurable représentent ces traces olfactives en termes de concentrations, sans pouvoir à ce jour apporter d'éléments de réponse précis et définitifs car aucun appareil de mesure n'atteint le niveau de performance des narines animales.

---

## *Etude III*

---

### *Impact du métabolisme des odorants sur leur perception post-conditionnement*

#### *1. Introduction*

Une compétition enzymatique peut se produire lorsque plusieurs substrats sont en concurrence pour se lier au site actif d'une même enzyme, ou en dehors de ce site actif selon le type d'enzyme. Cette situation se rencontre classiquement lorsque des substrats distincts ont une affinité similaire pour la même enzyme. Dans ce cas, la présence d'un substrat de plus grande affinité et/ou de concentration plus élevée peut inhiber l'activité de l'enzyme vis-à-vis d'un autre substrat, et réduire la probabilité de liaison de ce dernier à l'enzyme, laissant le second substrat s'accumuler. Dans le cas des EMX olfactives, la perception d'un odorant peut être influencée par la présence d'un autre odorant métabolisé par les mêmes enzymes. Ce mécanisme a été montré, chez le lapereau, concernant l'inhibition du métabolisme enzymatique GST dépendant de la PM par un substrat odorant compétiteur non réactogène, le 2-méthyl-2-penténal (2M2P) (Hanser et al., 2017). Ainsi, le mélange 2M2P + PM, avec le 2M2P présent en solution à une concentration 3 fois plus forte que la PM, favorise la réactivité des lapereaux à la PM pourtant présentée (via le test d'activation orale à la baguette) à une concentration normalement trop faible pour être réactogène (voir section D2.2 de l'Introduction générale). Autrement dit, la présence de 2M2P a alors pour effet d'abaisser le seuil de détection de la PM en augmentant la disponibilité de la PM. Une telle compétition peut-elle également influencer la perception d'un odorant, non pas spontanément significatif, mais préalablement appris par le lapereau ?

Dans la présente étude III, nous avons impulsé une série d'expérimentations (toujours en cours) visant à étudier l'impact que joue un odorant compétiteur sur la perception d'un autre odorant, préalablement appris, ayant les mêmes voies de métabolisation. Pour cela, sachant que le 2M2P est un bon substrat des GSTs (Legendre et al., 2014), nous l'avons utilisé ici comme odorant nouveau, en le conditionnant par association avec la PM. Nous l'appellerons odorant C dans la suite du texte, afin d'éviter toute confusion avec les odorants de l'étude II. En termes de compétiteur enzymatique de cet odorant, nous avons choisi le 3-méthyl-2-buténal (3M2B), nommé odorant D, car il était également connu pour être un bon substrat des GSTs (Legendre et al., 2014).

De plus, dans l'étude de Hanser et al. (2017), les odorants C et D avaient été utilisés comme compétiteurs de la PM; ici, dans un esprit de comparaison, nous les avons réutilisés mais avec D comme compétiteur de C. Les résultats ont montré que la présence de l'odorant D avec l'odorant C appris augmente significativement la réactivité des lapereaux à des concentrations de C très basses, parfois non réactogènes en absence de compétiteur.

## *2. Matériels et méthodes*

### *2.1. Animaux*

Les animaux provenaient de l'animalerie du CRNL, et étaient hébergés dans les mêmes conditions que celles décrites précédemment (section 2.2.1 de l'étude II). Soixante et onze lapereaux provenant de 16 portées différentes ont été utilisés. Comme dans l'étude II, les conditions expérimentales entraient dans le cadre de l'approbation éthique délivrée par les comités d'éthique pour l'expérimentation animale de l'Université Lyon 1 (CEEA-42 et -55) et le ministère français de l'enseignement supérieur et de la recherche (no. APAFIS #27874-2020110416356847 v2).

### *2.2. Odorants*

Le stimulus inconditionnel était la phéromone mammaire (PM; 2-méthyl-2-buténal ; CAS# 497-03-0) et le stimulus conditionnel le 2-méthyl-2-penténal (odorant C; CAS #623-36-9). Les odorants utilisés en mélange avec le 2M2P était le 3-méthyl-2-buténal en tant que compétiteur (odorant D ; CAS #107-86-8) et, en plus avec vocation de constituer un contrôle, l'acétate d'éthyle que nous qualifierons ici d'odorant E (CAS #141-78-6). Tous les odorants provenaient de chez Sigma-Aldrich (Saint-Quentin-Fallavier, France) et étaient préparés par dilutions successives dans l'eau distillée, avec des pas de 10 ou de 100 à partir d'une solution stock à  $10^{-2}$  g/ml.

### *2.3. Seuil de perception de l'odorant C*

Le seuil de perception de C a été déterminé en utilisant la technique de conditionnement/tests de rétention comme décrit dans les sections 2.3 et 2.4 de l'étude II. Répartis en groupes de 4-5 individus, des lapereaux de J2-J3 ont été conditionnés à une concentration fixe de l'odorant C :  $10^{-5}$  g/ml. La PM était également utilisée à  $10^{-5}$  g/ml, concentration habituelle de conditionnement. Le lendemain, les lapereaux ont été testés à 5 à 6 concentrations de C allant de



$10^{-2}$  à  $10^{-22}$  g/ml, incluant C et la PM à  $10^{-5}$  g/ml comme contrôles testés en avant dernière et dernière positions, respectivement.

#### *2.4. Compétition enzymatique C+D*

Des lapereaux, conditionnés à C  $10^{-5}$  g/ml à J2-J3, ont été testés le lendemain au mélange C+D. L'odorant C dans le mélange se trouvait à la concentration du seuil de perception ou bien à une concentration juste en-dessous. La concentration de D (décrite ci-dessous pour participer au mélange inducteur d'une compétition enzymatique) était de  $10^{-5}$  g/ml. Elle avait été choisie après que nous ayons testé l'efficacité de D dans le mélange à plusieurs concentrations :  $10^{-5}$ ,  $10^{-10}$ ,  $10^{-15}$  et  $10^{-17}$  g/ml. Je ne détaille pas les résultats ici pour ne pas alourdir inutilement le texte, mais seule la concentration  $10^{-5}$  g/ml s'est révélée efficace.

#### *2.5. Contrôles*

Outre le fait que l'odorant E ait été choisi comme contrôle en tant que « non compétiteur » de l'odorant C, car E n'est pas un substrat des GSTs (Legendre et al., 2014), E a également été utilisé dans le mélange C+E à la concentration  $10^{-5}$  g/ml mais aussi à la concentration  $10^{-6}$  g/ml, ceci afin de réduire les risques de biais liés à la différence de volatilité d'avec l'odorant D (E étant 10 fois plus volatile que le D, pression de vapeur saturante de l'odorant E : 73 mmHg versus celle de D : 7 mmHg). Des contrôles ont été réalisés également chez des lapereaux de J2-J3 « naïfs », c'est-à-dire non conditionnés, afin de vérifier que l'odorant D (à  $10^{-5}$  g/ml), l'odorant E (à  $10^{-5}$  et  $10^{-6}$  g/ml) et le mélange C+D n'induisaient pas spontanément de réponse comportementale. Effectivement, aucun lapereau n'a répondu à ces stimuli.

#### *2.6. Analyse statistique*

Comme lors de l'étude II (voir la section 2.5. de cette étude), lorsque les données étaient dépendantes (lapereaux du même groupe testés à des différents stimuli) les comparaisons étaient effectuées via le test Q de Cochran suivie du test 2 x 2 de McNemar. Lorsque les données étaient indépendantes (lapereaux de groupes différents testés aux mêmes stimuli), les comparaisons étaient faites via le test du  $\chi^2$  de Pearson. Les analyses ont été effectuées avec XLSTAT (Microsoft, Redmond, USA) et les données considérées comme significatives lorsque les tests fournissaient une p-value < 0,05.

### 3. Résultats

#### 3.1. Seuil de détection-perception de l'odorant C

Une façon de déterminer si la présence de l'odorant D pouvait influencer la perception de l'odorant C, consistait à mélanger D avec une concentration normalement non perçue ou à la limite de perception de C lorsque ce dernier était présenté seul. Ainsi, nous avons tout d'abord conditionné C à une concentration précise,  $10^{-5}$  g/ml par association avec la PM, puis nous avons, comme dans l'étude II, testé la réponse des lapereaux à une gamme de concentrations décroissante de C allant de  $10^{-2}$  à  $10^{-22}$  g/ml afin de révéler son seuil de détection-perception post-conditionnement. La réponse des lapereaux ( $n= 5$  à  $9$ ) pour l'odorant C s'étalait sur une gamme allant de  $10^{-4}$  à  $10^{-16}$  g/ml (55-100%). Leur réactivité était par contre faible à  $10^{-3}$  g/ml (20%) et nulle à  $10^{-2}$  et au-dessous de  $10^{-16}$  g/ml (Figure 36). Ceci montre que le seuil de détection-perception de l'odorant C se trouve à  $10^{-16}$  g/ml pour un conditionnement à  $10^{-5}$  g/ml.

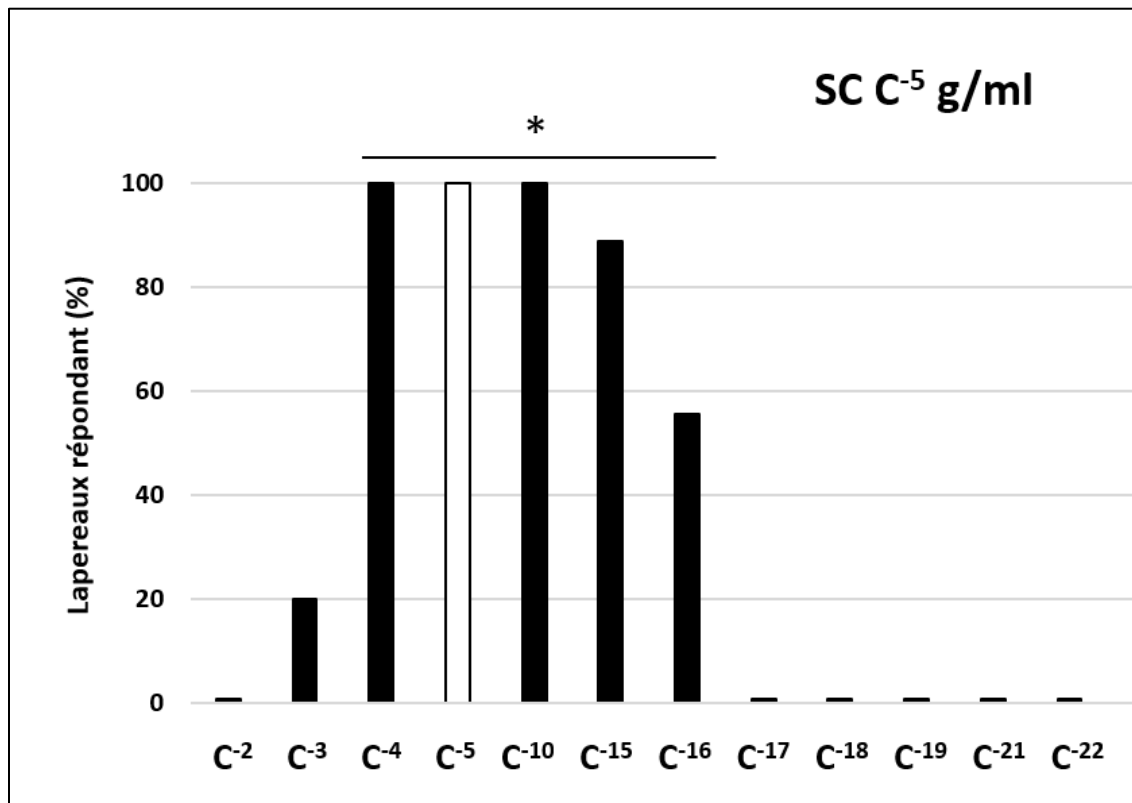


Figure 36: Proportions de lapereaux répondant (en ordonnées) à différentes concentrations d'odorant C (en abscisse) après apprentissage de celui-ci par association avec la PM. La barre la plus claire signale la proportion de répondants à la concentration apprise de C ( $10^{-5}$  g/ml). L'astérisque indique une différence significative entre les concentrations en question et les autres concentrations testées ( $p \leq 0,05$ ).

### 3.2. Seuil de détection-perception de l'odorant C en présence de l'odorant D

Par la suite, en prenant la concentration d'odorant C située juste au-dessous de son seuil de détection, n'induisant aucune réactivité chez les lapereaux, à savoir  $10^{-17}$  g/ml, nous avons testé l'activité de cette concentration lorsque C était mis en mélange avec l'odorant D, utilisé à différentes concentrations :  $10^{-5}$ ,  $10^{-10}$ ,  $10^{-15}$  et  $10^{-17}$  g/ml (n= 6 lapereaux testés par mélange). Les résultats ont montré qu'avec D utilisé à  $10^{-5}$  g/ml, la réactivité des lapereaux au mélange D + C  $10^{-17}$  g/ml montait à 66% (Figure 37). Cette augmentation, bien que sensible en pourcentage, n'était pas significative ( $p = 0,125$ ) sans doute du fait du petit nombre de lapereaux testés. Aucune autre concentration de D ne conduisait à un tel niveau de répondants (Figure 37), ce qui suggère que D  $10^{-5}$  g/ml engendre bien un effet singulier sur la perception de l'odorant C.

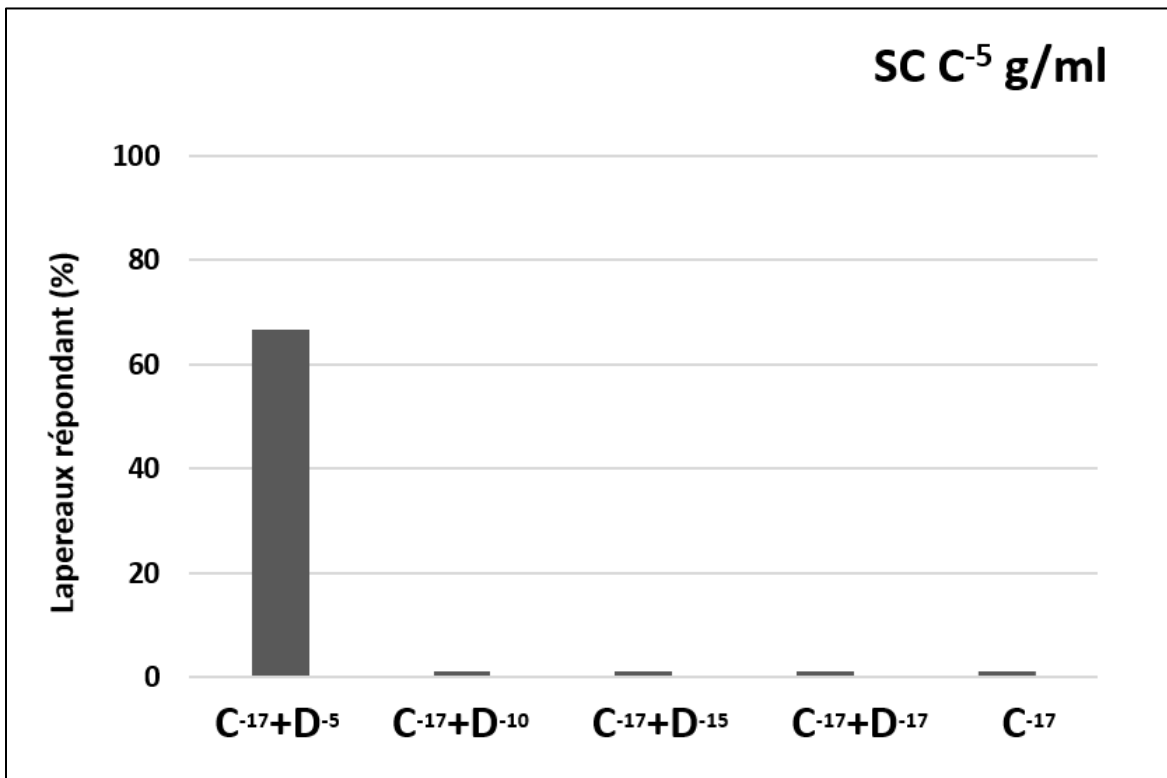


Figure 37: Proportions de lapereaux répondant (en ordonnées), après conditionnement à l'odorant C à la concentration  $10^{-5}$  g/ml, à une concentration inférieure de C inférieure à son seuil de détection-perception ( $C^{-17}$  g/ml) lorsque C est présenté en mélange avec l'odorant D à diverses concentrations ( $D^{-5}$ ,  $D^{-10}$ ,  $D^{-15}$  et  $D^{-17}$  g/ml) (en abscisse).

Afin de confirmer ces résultats, nous avons testé à nouveau le mélange  $C^{-17}+D^{-5}$  chez un plus grand nombre de lapereaux (n=21, 5 portées) (Figure 38). La réponse des lapins à C à la concentration  $10^{-17}$  g/ml a augmentée de 0 à 62% ( $p < 0,001$ ) en présence de l'odorant D. Nous

avons également exposé d'autres lapereaux (n=9, 2 portées) au mélange  $C^{-16}+D^{-5}$  afin de définir si la présence de l'odorant D affectait la réactivité des lapereaux à la concentration seuil de C ( $10^{-16}$  g/ml), sachant qu'un peu plus de la moitié des nouveau-nés (56%) répondaient à cette concentration lorsque C était présenté seul. Il s'avère que la présence de D augmentait de 33% (p = 0,25) la réactivité des lapereaux à la concentration  $10^{-16}$  g/ml, induisant une réactivité finale de 89%. Cependant, en raison du manque de temps, nous n'avons pas pu tester des concentrations au-dessous de  $10^{-16}$  g/ml ou au-dessus de  $10^{-17}$  g/ml dans le mélange C+D. En termes de contrôles complémentaires, aucune réponse n'a été spontanément engendrée par l'odorant D présenté seul à la concentration  $10^{-5}$  g/ml (n=15 lapereaux, 3 portées) ni au mélange  $C^{-17}+D^{-5}$  chez des lapins naïfs, non conditionnés (n=10, 2 portées) ; cela indique que la réponse comportementale induite par D lorsque mis en mélange avec C  $10^{-16}$  et  $10^{-17}$  g/ml après apprentissage de C, n'était pas due à une réponse à D lui-même (Figure 39).

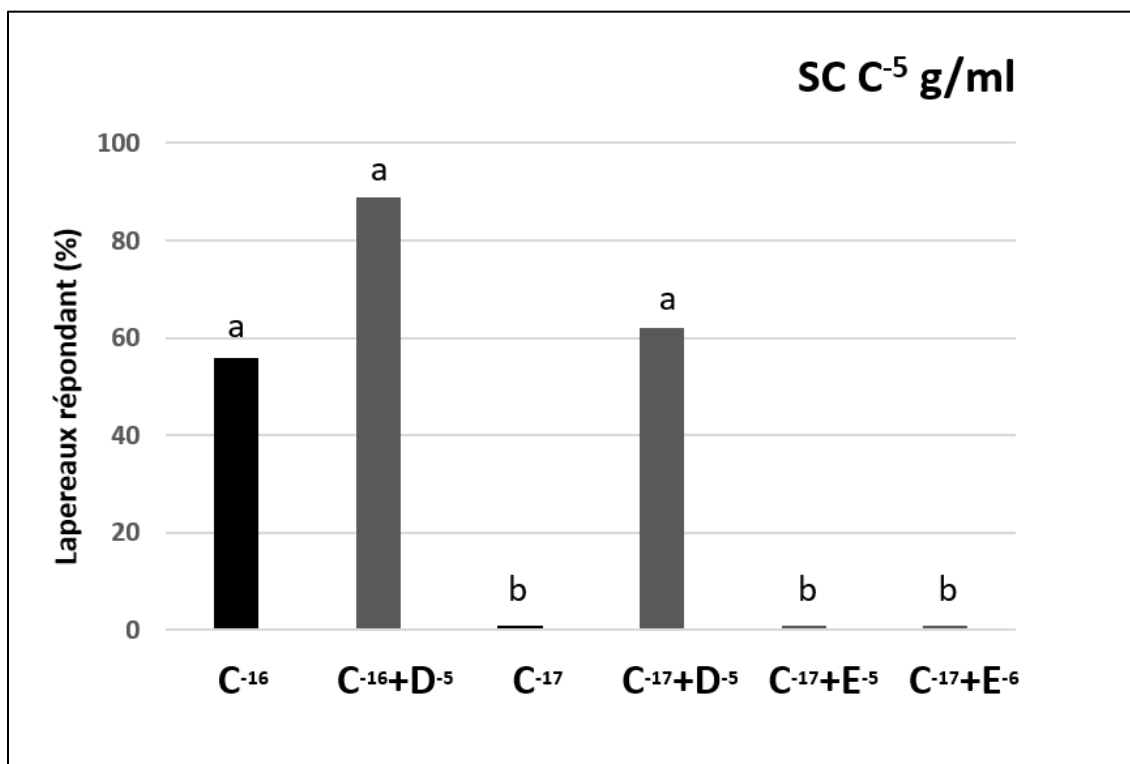


Figure 38: Proportions de lapereaux répondant (en ordonnées), après conditionnement à l'odorant C  $10^{-5}$  g/ml, à la concentration du seuil de détection-perception de C ( $C^{-16}$  g/ml) ou une concentration juste inférieure au seuil ( $C^{-17}$  g/ml), ainsi qu'aux mélanges  $C^{-16}+D^{-5}$ ,  $C^{-17}+D^{-5}$ ,  $C^{-17}+E^{-5}$  et  $C^{-17}+E^{-6}$  (en abscisse). Les lettres a et b indiquent une différence significative (p ≤ 0,001).

### 3.3. Seuil de détection-perception de l'odorant C en présence de l'odorant E

Afin de vérifier que l'effet observé ci-dessus sur la perception de l'odorant C en présence de D était bien liée à une compétition impliquant les GSTs, nous avons testé, 24h après conditionnement avec la PM, la réponse des lapereaux J3-J4 à l'odorant C présenté à  $10^{-17}$  g/ml en présence cette fois-ci d'un odorant E n'étant pas connu pour être métabolisé par les GSTs. Comme dans l'essai précédent avec D l'odorant E a été présenté à  $10^{-5}$  g/ml dans le mélange C+E. Mais, en plus, il l'a également été à  $10^{-6}$  g/ml à d'autres lapereaux, afin de tenir compte de la différence de volatilité entre les odorant E et l'odorant D (pression de vapeur saturante de l'odorant E : 73 mmHg contre 7 mmHg pour D), l'odorant E étant 10 fois plus volatil que D.

En termes de résultats, les lapereaux n'ont montré aucune réactivité à l'odorant C  $10^{-17}$  g/ml en présence de l'odorant E, quelle que soit la concentration de ce dernier (n=15, 3 portées) (Figure 39).

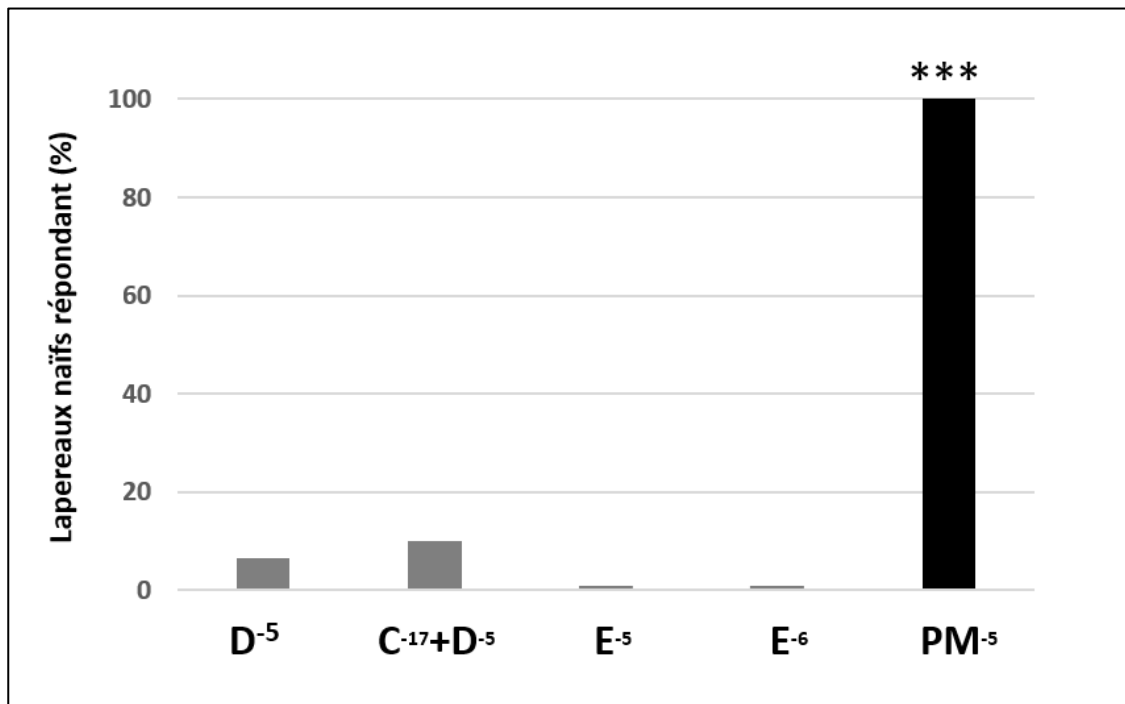


Figure 39: Proportions de lapereaux naïfs non conditionnés répondant (en ordonnées) à l'odorant D à la concentration  $10^{-5}$  g/ml, au mélange  $C^{-17}+D^{-5}$ , à l'odorant E aux concentrations  $10^{-5}$  et  $10^{-6}$  g/ml, ainsi qu'à la PM à la concentration  $10^{-5}$  g/ml. Les astérisques indiquent une différence significative ( $p \leq 0,001$ ).

#### 4. Discussion partielle

Cette étude, menée dans les derniers mois de ma thèse, visait à débiter l'exploration de l'impact de la compétition enzymatique entre deux odorants sur la perception de l'un d'entre eux, après que celui-ci ait acquis une signification biologique par apprentissage. L'idée était donc de déterminer si ce que nous avons vu dans le cas d'une telle compétition sur la perception d'un signal phéromonal (dans notre cas la PM, section D2.2 de l'introduction générale), était généralisable à d'autres odorants, non spontanément pertinents pour les lapereaux, mais le devenant par conditionnement associatif précoce. Les résultats confirment que l'ajout d'un substrat compétiteur, le 3M2B (odorant D), module de manière significative la perception d'un odorant appris (le 2M2P, odorant C), lorsque les deux partagent une même voie de métabolisation par les GSTs.

La première phase de l'étude visait à déterminer le seuil de détection-perception de l'odorant C. Les lapereaux, conditionnés à C à  $10^{-5}$  g/ml ont répondu à C sur une large gamme de concentrations allant de  $10^{-4}$  à  $10^{-16}$  g/ml, d'où un seuil de détection-perception de C se situant autour de  $10^{-16}$  g/ml. Ces résultats sont concordants avec les données de notre étude II montrant, lorsque le SC a été appris à une concentration relativement forte, une généralisation de la réactivité des lapereaux sur une large gamme de perception de l'odorant appris, incluant un seuil de détection bas. La volatilité de l'odorant C (7 mmHg) se situant entre celles des odorant A (25,4 mm Hg) et B ( $1,45 \cdot 10^{-4}$  mm Hg), ce résultat confirme la généralisation de cet effet pour tous les odorants testés à ce jour, indépendamment de leur volatilité.

La deuxième phase de l'expérience explorait l'effet, sur la perception de C, d'un odorant compétiteur des mêmes enzymes du métabolisme des xénobiotiques - les GSTs -, l'odorant D. Lorsque l'odorant C était testé, post-apprentissage, à la concentration de son seuil de détection-perception ( $10^{-16}$  g/ml) dans le mélange C+D, la réactivité des lapereaux augmentait de 56% à 89% (augmentation de 33%, mais non significative en l'état). Par contre, lorsque l'odorant C se trouvait à une concentration juste au-dessous du seuil ( $10^{-17}$  g/ml) dans le même mélange, la réactivité des lapereaux augmentait significativement de 0 à 62%. Cet effet ne s'observait pas lorsque l'odorant C était testé avec l'odorant E (acétate d'éthyle), qui n'est pas métabolisé par les GSTs. L'absence de modification de la réactivité des lapereaux à C en présence de E montre que l'effet n'est pas dû à une simple addition de stimuli olfactifs entrant simultanément dans les narines des lapereaux, mais à une probable interaction au niveau enzymatique. Ces résultats soutiennent l'hypothèse d'une

compétition enzymatique au niveau des GSTs qui favorise la perception de l'odorant appris, même à des concentrations spontanément indétectables par les lapereaux.

Un aspect important de ces résultats réside dans la « spécificité » de la compétition. La présence de l'odorant D augmente la réactivité à C, mais seulement lorsqu'il est présent à une concentration spécifique ( $10^{-5}$  g/ml). D'autres concentrations de D (comme  $10^{-10}$ ,  $10^{-15}$  ou  $10^{-17}$  g/ml) n'ont pas de conséquence sur la perception de C, soulignant ainsi la nécessité d'un équilibre chimique précis dans la compétition entre les odorants pour que, *in fine*, les lapereaux expriment une réponse comportementale. Par ailleurs, l'absence de réponse chez les lapereaux naïfs exposés au mélange C+D confirme que l'effet observé dépend du conditionnement préalable à l'odorant C, et non d'une réactivité spontanée à D. Le phénomène de compétition enzymatique et l'importance des concentrations inter-odorants avait été pointé par des études antérieures, comme celles de Hanser et al. (2017), ayant montré que l'ajout d'un odorant compétiteur favorisait la réactivité à la PM pourtant à une concentration sous-liminaire chez les lapereaux, seulement s'il était présent 3 fois plus dans le mélange avec la PM que cette dernière ( $10^{-5}$  g/ml vs.  $10^{-9}$  g/ml). Dans l'étude de Hanser et al., le compétiteur utilisé était le 2M2P, c'est-à-dire le même odorant que l'odorant C que nous avons choisi ici comme stimulus conditionné, et dont nous avons montré que la perception post-conditionnement était modulable par la présence d'un autre compétiteur des GSTs, l'odorant D. L'activité de ces enzymes métabolisant les odorants peut donc influencer non seulement la perception de stimuli chimiosensoriels ayant une valeur biologique spontanée (PM), mais aussi de stimuli dont la valeur biologique positive découle d'un apprentissage.

En conclusion, cette étude préliminaire met en lumière l'importance des interactions enzymatiques dans la modulation de la perception olfactive dans le cadre d'odeurs apprises, ce qui, à notre connaissance, n'avait encore jamais été décrit dans la littérature. La compétition entre odorants au niveau des EMX semble jouer un rôle clé dans l'amplification ou l'inhibition des réponses olfactives à des stimuli biologiques d'intérêt, que cet intérêt soit spontané ou consécutif à un apprentissage. Cela souligne la nécessité, quand on souhaite étudier la perception et la réponse comportementale d'organismes à certaines odeurs, de considérer non seulement les propriétés chimiques des odorants, mais aussi leur contexte métabolique, c'est-à-dire les interactions potentielles entre ces odorants en rapport avec les enzymes qui les métabolisent.

---

## *Discussion finale, conclusion et perspectives*

---

La perception olfactive, loin d'être un processus purement centralisé, est fortement influencée par les événements se déroulant dès la périphérie du système olfactif. Les EMXs présentes dans les narines jouent un rôle clé en modifiant la biodisponibilité des molécules odorantes pour les ROs, c'est-à-dire en métabolisant ces molécules odorantes concomitamment avec leurs liaisons aux récepteurs. Cela influence la qualité et la durée du signal olfactif (Schilling et al., 2010; Faure et al., 2016; Robert-Hazotte et al., 2022). Cette prise en charge enzymatique périphérique semble cruciale pour la détection efficace des odeurs, et pour éviter la saturation des ROs par des concentrations excessives d'odorants. Le lapin nouveau-né, notre modèle d'étude, permet de lier les aspects mécanistiques de l'olfaction avec le comportement, grâce à la PM et à son double pouvoir, déclencheur d'une part, et de façon spontanée, du comportement vital pour le nouveau-né de recherche-saisie orale des mamelles et déclencheur, d'autre part, de l'apprentissage de nouvelles odeurs.

Aussi, la thèse s'est articulée autour de deux volets principaux, distincts mais complémentaires, qui ont abouti aux études I et II décrites dans ce manuscrit, toutes deux ayant nécessité plusieurs mois, voire années, d'expérimentations: l'une portant sur les EMXs, en particulier les GSTs impliquées dans le métabolisme et la perception de la PM, menée au CSGA de Dijon, et l'autre axée sur l'effet de la concentration et de la volatilité des odeurs apprises par association avec la PM sur l'« apprennabilité » de ces odeurs par les lapereaux, et la réactivité à ces odeurs, post-conditionnement, des nouveau-nés. Prises ensemble, ces études offrent une compréhension originale et essentielle des connexions qui existent donc en permanence entre mécanismes périphériques de traitement des molécules olfactives, voies centrales consécutives de traitement (non directement explorées dans ma thèse, si ce n'est par une approche cognitive sollicitant l'apprentissage), et conséquences comportementales qui en découlent. Notre étude III en est une preuve concrète, puisqu'elle établit un lien direct entre l'apprentissage de certains odorants, la mémoire olfactive et le rôle des enzymes périphériques dans la modulation des de l'action des stimuli olfactifs, notamment dans des contextes de mélanges d'odorants.

L'étude I s'est concentrée sur l'exploration de divers aspects métaboliques, cellulaires et moléculaires des GSTs au niveau de la muqueuse olfactive, des points jusqu'alors peu documentés



dans la littérature, en particulier chez les mammifères nouveau-nés. Ces enzymes avaient été récemment reconnues comme étant des modulateurs essentiels de la perception de la PM, la molécule cruciale pour la survie de notre modèle d'étude, le lapin nouveau-né (Hanser et al., 2017; Legendre et al., 2014; Robert-Hazotte et al., 2019). Notre étude I, en prolongeant ces données, a permis d'aboutir à plusieurs résultats intéressants permettant d'améliorer la compréhension du métabolisme nasal, à cet âge. Les tests *in vitro* ont révélé que les trois classes de GSTs étudiées (GSTA1, GSTM1, et GSTP1) peuvent efficacement conjuguer la PM, tout en suivant probablement des dynamiques distinctes. La distribution cellulaire des GSTs semble varier selon la classe: par exemple, la GSTP1 est fortement exprimée dans l'ensemble de l'épithélium olfactif, avec une concentration particulière au niveau des noyaux des cellules sustentaculaires, tandis que la GSTA1 se localise principalement dans les glandes de Bowman. Cela suggère que les GSTs pourraient jouer des rôles variés selon leur localisation dans le tissu olfactif. Enfin, l'étude révèle des différences significatives dans l'expression des GSTs en fonction de l'âge et de l'exposition à la PM, suggérant que ces enzymes s'ajusteraient aux besoins spécifiques des lapins au cours de leur développement. L'avantage de notre modèle est que le lapin présente un développement très rapide avec, dans les quatre semaines qui séparent naissance et sevrage, une évolution sensible de ses capacités sensori-motrices (mise en place de l'audition vers 7-8 jours, de la vue vers 10-12 jours, des capacités masticatoires en préambule de la sortie du nid et du début d'ingestion d'aliment solide vers 15-20 jours) (Coureaud et al., 2008b). L'influence de l'âge sur l'expression des enzymes olfactives est corroborée par un petit nombre d'étude réalisée chez d'autres espèces montrant que cette expression peut s'installer très tôt (embryon) et continuer à varier chez les animaux âgés. Cependant la fonction des variations, qu'elles soient médiées par l'âge ou par une exposition à un composé odorant, comme dans notre étude, sont toujours à mettre en balance avec l'activité de détoxification de ces enzymes qui ne peut être véritablement dissociée de leur activité dans l'olfaction (Getchell et al., 1993b; Kulkarni-Narla et al., 1997; Gradinaru et al., 1999; Gu et al., 2000; Seo et al., 2018; Yoshikawa et al., 2018b) . Ainsi, cette organisation est probablement le résultat évolutif d'un équilibre optimal entre les fonctions de détoxification et les fonctions sensorielles des GST chez les lapins nouveau-nés, visant à maintenir l'efficacité maximale de l'épithélium olfactif pour traiter le signal biologique essentiel que constitue la PM. Les interactions entre odorants et enzymes telles que les GSTs nécessitent des investigations plus poussées, notamment pour comprendre précisément les mécanismes biochimiques sous-jacents à cette

modulation. Cela pourrait passer par des études *ex vivo* ou *in vitro* avec des tissus olfactifs, voire des tests utilisant des protéines recombinantes pour mesurer les interactions spécifiques entre substrats et enzymes. Outre la mesure de l'activité enzymatique, la mesure des paramètres cinétiques enzymatiques ( $V_{max}$ ,  $K_m$ ) vis-à-vis des différents substrats permettrait de mieux comprendre les différentes affinités des substrats pour chaque enzymes pour mettre en relation leur fonction et leur seuils de détection/perception olfactif, et également potentiellement d'anticiper des mécanismes de compétition entre odorants (Heydel et al., 2019; Schwartz et al., 2020). Il serait également pertinent de compléter notre analyse en examinant le conjugué PM-glutathion produit par les GSTs et de tester son activité ou absence d'activité sur le comportement (et, le cas échéant, son traitement périphérique par mesures électrophysiologiques). En effet, il est impossible d'affirmer à ce jour que la molécule réellement active sur le comportement du lapereau est la PM, son conjugué, ou les deux. Ce travail est actuellement en cours dans le cadre d'une étude annexe menée en collaboration avec l'équipe FLUID du CRNL. Il est d'importance car ce type de question se pose pour tout odorant générant une perception positive ou négative, spontanément ou non, chez un organisme exposé à une odeur, y compris chez des sujets humains. D'ailleurs, sur le plan comparatif, une autre perspective de recherche consisterait à comparer les effets perceptifs observés ici chez le lapereau suite aux actions métaboliques, avec ceux observés chez d'autres espèces de mammifères ayant des stratégies de survie plus ou moins recouvrantes avec celles du lapin, notamment chez les jeunes animaux habitant des conditions de vie extrêmes ayant besoin de systèmes d'adaptation et de régulation sophistiqués pour assurer leur survie (Teulier et al., 2012). En parallèle, des études récentes sur les insectes ont montré que les GSTs jouent un rôle crucial dans le métabolisme des phéromones émis par leurs congénères ou d'autres composés odorants dégagées de leur environnement, suggérant ainsi un parallèle évolutif possible dans les mécanismes de traitement des phéromones entre différentes espèces (Rogers et al., 1999; Li et al., 2018; Schwartz et al., 2020, 2023).

L'étude II, qui intègre forcément le mécanisme intrinsèque d'action des EMXs - que nous n'avons pas étudié directement ici à ce jour - s'est concentrée sur la PM et son effet sur l'apprentissage de nouvelles odeurs via son pouvoir renforçateur spontanément appétant. L'étude a exploré comment les lapereaux perçoivent des stimuli olfactifs appris individuellement, ici deux odorants choisis volontairement pour leurs volatilités très différentes, et présentés aux lapereaux à des concentrations très variées. L'objectif était de comprendre comment la concentration de

l'odorant conditionné (SC) affectait l'apprentissage et le comportement des lapereaux, ainsi que d'évaluer les seuils de détection et de reconnaissance post-apprentissage. L'étude met clairement en évidence la capacité des lapereaux nouveau-nés à détecter et à apprendre des odeurs à des concentrations spectaculairement faibles (ce que nous n'imaginions d'ailleurs pas, en tout cas pas à ce point), suggérant que leur système olfactif est hautement développé, au moins dès les premiers jours de la vie postnatale. La performance du système olfactif à la naissance chez cette espèce pourrait être essentielle pour établir des comportements de recherche de la mamelle ou autre, par exemple déclenchés, outre par la PM, par de nouveaux odorants détectés sur le corps de la lapine allaitante (pouvant contribuer à maximiser le succès de tétée ; Jouhannau et al., 2016) ou, dans l'environnement extérieur une fois les lapereaux sortis du nid (odeurs d'autres partenaires sociaux, de ressources alimentaires, etc.). Les résultats soulignent également l'importance de la concentration des stimuli olfactifs à la fois durant la phase d'apprentissage elle-même (ici le conditionnement associatif) et dans la phase de rétention/réactivité post-conditionnement. Par exemple, les lapereaux conditionnés à des concentrations relativement élevées (telles que  $10^{-5}$  et  $10^{-10}$  g/ml) répondent ensuite au stimulus conditionné sur une large gamme de concentrations de celui-ci, alors que les lapereaux conditionnés aux concentrations les plus faibles pouvant être apprises ne répondent ensuite qu'à la concentration apprise ou à des concentrations immédiatement voisines. La plage de réactivité des nouveau-nés au stimulus conditionné se rétrécit ainsi à mesure que la concentration de conditionnement diminue. Les deux odorants étudiés conduisent à un pattern similaire de réponses concentration-dépendante des lapereaux, avec une meilleure sensibilité face à l'odorant le moins volatile. Ces résultats apportent un éclairage précieux sur les remarquables capacités olfacto-cognitives et comportementales des mammifères à la naissance, capacités qui ont été longtemps ignorées dans l'histoire des sciences, et dont beaucoup restent à découvrir.

Une perspective intéressante de cette étude serait d'examiner comment la gamme de réactivité des lapereaux évolue, non seulement face à des odorants présentés séparément, mais également face à leurs mélanges, par exemple dans notre cas le mélange des odorants A+B. Nous pourrions ainsi observer si les effets observés quand un odorant est appris seul puis testé seul, sont similaires ou si ils diffèrent quand le test de détection-perception présente l'odorant non pas seul mais avec l'autre odorant. Nous pourrions également déterminer ce qu'il en est lorsque les lapereaux sont conditionnés au mélange, puis testés avec les odorants seuls. Et enfin ce qui se

passer lorsque les odorants sont à la fois présentés en mélange au moment du conditionnement et au moment du test. Cela permettrait de mieux comprendre le fonctionnement du système olfactif des lapins nouveau-nés dans des contextes écologiquement plus réalistes, où l'exposition à des mélanges d'odorants est plus courante que celle à des odorants isolés.

De futures recherches pourraient également se pencher sur les mécanismes neurobiologiques sous-jacents aux effets perceptifs que nous avons observés, notamment à travers des techniques telles que l'électrophysiologie ou l'imagerie cérébrale. Nous avons mené quelques essais visant à explorer la réponse électrophysiologique des neurones sensoriels olfactifs (réponse populationnelle) après stimulation de la muqueuse olfactive de lapins conditionnés à différentes concentrations de l'odorant A et B notamment à  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$  et  $10^{-6}$  g/ml. Les résultats ont montré des EOGs à amplitudes similaires post-apprentissage quelle que soit la concentration. Cette absence de variation pourrait s'expliquer soit par une adaptation du tissu olfactif soit par une saturation des récepteurs olfactifs, qui aurait pu limiter la capacité de réponse des neurones à des concentrations plus ou moins élevées (dans une gamme il est vrai très limitée ici). Il est également possible que la technique d'électrophysiologie utilisée ne soit pas suffisamment sensible pour détecter de subtiles différences. Néanmoins, ces observations – qui demeurent largement à compléter – suggèrent qu'il est possible que les modulations de réponse comportementale constatées dans notre étude II en fonction de la concentration ne soit pas attribuable à des changements au niveau des neurones sensoriels olfactifs. Elles résulteraient plutôt peut-être de mécanismes de traitement de l'information à des niveaux supérieurs - centraux - du système olfactif.

L'étude III a été conçue, en fin de thèse, un peu comme une preuve de concept (adaptée au temps restant) visant à tester l'implication des EMXs dans le métabolisme et la détection de stimuli olfactifs ayant été appris, et non de ceux ayant une activité spontanée sur le comportement comme c'est le cas de la PM. L'idée principale était qu'un odorant neutre, sans valence hédonique particulière, entrant en compétition métabolique avec un odorant ayant, lui, acquis une valence positive par association avec la PM, pourrait favoriser la sensibilité des lapereaux à ce dernier même à des concentrations très faibles de celui-ci. Dans les faits, il est effectivement apparu que la réactivité des lapereaux à un odorant augmente significativement à des concentrations où il est normalement non perçu, lorsque l'odorant est en mélange avec un autre odorant sollicitant les

mêmes enzymes (GSTs), démontrant ainsi un effet de synergie dû à la compétition enzymatique. En revanche, cet effet n'est pas observé lorsque l'odorant cible est mélangé avec un odorant non métabolisé par les GSTs, ce qui confirme que l'effet perçu est réellement lié à la compétition enzymatique et non à une simple addition de stimuli olfactifs. Cette expérience montre que le métabolisme compétitif des odorants, impacte non seulement la perception de la PM comme nous l'avions montré lors de l'étude I, mais également la perception d'un odorant non spontanément significatif pour les lapereaux, mais le devenant après apprentissage. Il y aurait donc une généralisation de l'effet du métabolisme enzymatique sur la perception d'odorants en mélange. Cependant, pour que cette généralisation soit pleinement démontrée, il conviendrait de poursuivre notre étude III. Ainsi, de nouveaux essais pourraient être menés afin de 1. vérifier avec un autre odorant appris que l'odorant C utilisé ici, que des résultats convergents s'observent (par exemple nous pourrions faire apprendre D et tester ensuite la réponse des lapereaux à ce dernier lorsqu'il est en mélange avec C) ; et 2. mettre en évidence la compétition enzymatique à d'autres échelles que celles étudiées ici, telles que la mesure *ex vivo* sur tissu olfactif ou bien *in vitro* à partir des protéines recombinantes de GSTs.

Le métabolisme compétitif des odeurs semble donc, même si cela reste à confirmer plus avant, susceptible d'intervenir dans le quotidien de vie assez large des lapins nouveau-nés. De fait, les résultats de cette étude pourraient également avoir des applications pratiques dans les domaines de l'élevage et du bien-être animal. Une meilleure compréhension de la manière dont les lapereaux perçoivent et apprennent à reconnaître les odeurs pourrait par exemple permettre de développer des stratégies favorisant i) l'identification de lapereaux ayant des déficits perceptifs dans les tous premiers jours de vie, ii) l'exposition de ces derniers à des odorants compétiteurs des mêmes EMX afin d'optimiser leur perception de la PM sous la mère ou en éventuelle situation d'allaitement artificiel, iii) la supplémentation en odorants ou mélanges d'odorants de l'aliment solide traditionnel afin d'améliorer l'appétence de ce dernier, et de faciliter la transition aliment lacté-aliment solide source d'une mortalité non négligeable en élevage (Paës et al., 2020).

La modulation de la perception olfactive via la compétition enzymatique ouvre également des perspectives hors espèce lapin *sensu stricto*. Elle pourrait s'avérer particulièrement pertinente chez les espèces évoluant dans des environnements riches en stimuli olfactifs, pour lesquelles la capacité à discriminer les signaux entre eux, notamment les phéromones, est cruciale pour la

survie, comme c'est le cas pour les abeilles, les fourmis et les papillons (Hoover et al., 2003; Dussutour et al., 2009; Tabuchi et al., 2013). Cette modulation enzymatique pourrait également avoir des applications thérapeutiques chez l'Homme, notamment dans le traitement de troubles de la perception olfactive tels que l'anosmie ou l'hyposmie. En ciblant les EMXs, il sera peut-être envisageable d'identifier si de tels troubles découlent en partie d'un déficit des sujets en certaines enzymes, de déterminer lesquelles, et le cas échéant d'étudier de possibles solutions permettant de palier à un tel déficit. Enfin, ces découvertes pourraient être d'utilité dans le domaine agro-alimentaire, dans la conception de produits adaptés au mieux aux besoins des consommateurs, et à leur sensibilité aux arômes alimentaires ou aux odeurs de produits cosmétiques, dans le respect de leur bien-être et de leur santé. L'utilisation d'odorants compétiteurs pourrait par exemple peut-être permettre de ralentir ou de contrôler la libération des odeurs dans les processus de création de parfums ou d'arômes, et d'exposition des consommateurs à ces produits, offrant ainsi un contrôle plus précis de leur diffusion.

Bien que les mécanismes sous-jacents à la sensibilité aux odeurs, qu'ils soient d'ordre chimico-moléculaire ou physico-physiologique, restent encore largement méconnus, les lapins nouveau-nés s'avèrent être un modèle animal particulièrement pertinent pour l'étude des processus olfactifs guidant le comportement. Malgré son immaturité apparente, cet organisme possède des capacités sensorielles, cognitives et comportementales remarquables dès la période de vie périnatale, offrant notamment une opportunité unique d'explorer la perception olfactive à des concentrations inédites. La complexité de l'univers olfactif, marquée par la diversité et le renouvellement constant des stimuli présents dans l'environnement dans lequel les organismes évoluent (que celui-ci soit aquatique, terrestre ou aérien), implique d'explorer des facteurs pluriels si l'on espère pouvoir approcher au mieux le fonctionnement de l'olfaction. Cette thèse a participé à l'approfondissement de la compréhension de la perception olfactive en mêlant des regards et approches complémentaires allant de l'étude de processus fonctionnels à l'échelle des odorants entrants dans le système olfactif principal périphérique, à celle de processus cognitifs et au comportement. Les trois principales études ont mis en évidence des modifications de la perception liées au métabolisme olfactif, à l'âge, à l'exposition aux odorants simples ou aux odorants en mélanges (ici binaires), à leurs concentrations, leurs volatilités, et à l'apprentissage. Ces travaux ouvrent de nouvelles perspectives de recherche à court et plus ou moins long terme dans des

domaines variés incluant l'olfaction, la neurophysiologie, l'éthologie/écologie, et même la biotechnologie.

---

## *Bibliographie*

---

- Aceto, A., Di Ilio, C., Angelucci, S., Felaco, M., & Federici, G. (1989). Glutathione transferase isoenzymes from human testis. *Biochemical Pharmacology*, *38*(21), 3653–3660.  
[https://doi.org/10.1016/0006-2952\(89\)90568-6](https://doi.org/10.1016/0006-2952(89)90568-6)
- Aimé, P., Duchamp-Viret, P., Chaput, M. A., Savigner, A., Mahfouz, M., & Julliard, A. K. (2007). Fasting increases and satiation decreases olfactory detection for a neutral odor in rats. *Behavioural Brain Research*, *179*(2), 258–264. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2007.02.012>
- Aimé, P., Hegoburu, C., Jaillard, T., Degletagne, C., Garcia, S., Messaoudi, B., Thevenet, M., Lorsignol, A., Duchamp, C., Mouly, A.-M., & Julliard, A. K. (2012). A physiological increase of insulin in the olfactory bulb decreases detection of a learned aversive odor and abolishes food odor-induced sniffing behavior in rats. *PloS One*, *7*(12), e51227.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0051227>
- Asakawa, M., Fukutani, Y., Savangsuksa, A., Noguchi, K., Matsunami, H., & Yohda, M. (2017). Modification of the response of olfactory receptors to acetophenone by CYP1a2. *Scientific Reports*, *7*, 10167. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-10862-5>
- Baly, C. (2021). *Plasticity Mechanisms at the Peripheral Stage of the Olfactory System*.
- Bansil, R., & Turner, B. S. (2018). The biology of mucus: Composition, synthesis and organization. *Advanced Drug Delivery Reviews*, *124*, 3–15. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2017.09.023>
- Barkat, S., Le Berre, E., Coureaud, G., Sicard, G., & Thomas-Danguin, T. (2012). Perceptual Blending in Odor Mixtures Depends on the Nature of Odorants and Human Olfactory Expertise. *Chemical Senses*, *37*(2), 159–166. <https://doi.org/10.1093/chemse/bjr086>
- Bassler, B. L. (2002). Small talk. Cell-to-cell communication in bacteria. *Cell*, *109*(4), 421–424.  
[https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(02\)00749-3](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(02)00749-3)



- Baum, M. J. (2012). Contribution of pheromones processed by the main olfactory system to mate recognition in female mammals. *Frontiers in Neuroanatomy*, 6, 20.  
<https://doi.org/10.3389/fnana.2012.00020>
- Baxter, B. D., Larson, E. D., Merle, L., Feinstein, P., Polese, A. G., Bubak, A. N., Niemeyer, C. S., Hassell, J., Shepherd, D., Ramakrishnan, V. R., Nagel, M. A., & Restrepo, D. (2021). Transcriptional profiling reveals potential involvement of microvillous TRPM5-expressing cells in viral infection of the olfactory epithelium. *BMC Genomics*, 22(1), 224. <https://doi.org/10.1186/s12864-021-07528-y>
- Berhane, K., Widersten, M., Engström, A., Kozarich, J. W., & Mannervik, B. (1994). Detoxication of base propenals and other alpha, beta-unsaturated aldehyde products of radical reactions and lipid peroxidation by human glutathione transferases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91(4), 1480–1484.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.91.4.1480>
- Berre, E., Thomas-Danguin, T., Béno, N., Coureaud, G., Etievant, P., & Prescott, J. (2008). Perceptual Processing Strategy and Exposure Influence the Perception of Odor Mixtures. *Chemical Senses*, 33, 193–199. <https://doi.org/10.1093/chemse/bjm080>
- Blass, E. M. (1990). Suckling: Determinants, changes, mechanisms, and lasting impressions. *Developmental Psychology*, 26(4), 520–533. <https://doi.org/10.1037/0012-1649.26.4.520>
- Bochicchio, V., & Winsler, A. (2020). The Psychology of Olfaction: A Theoretical Framework With Research and Clinical Implications. *Psychological Review*, 127, 442–454.  
<https://doi.org/10.1037/rev0000183>
- Bogdanffy, M. S., Sarangapani, R., Plowchalk, D. R., Jarabek, A., & Andersen, M. E. (1999). A biologically based risk assessment for vinyl acetate-induced cancer and noncancer inhalation toxicity. *Toxicological Sciences: An Official Journal of the Society of Toxicology*, 51(1), 19–35.  
<https://doi.org/10.1093/toxsci/51.1.19>

- Boichot, V., Menetrier, F., Saliou, J.-M., Lirussi, F., Canon, F., Folia, M., Heydel, J.-M., Hummel, T., Menzel, S., Steinke, M., Hackenberg, S., Schwartz, M., & Neiers, F. (2023). Characterization of human oxidoreductases involved in aldehyde odorant metabolism. *Scientific Reports*, *13*, 4876. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-31769-4>
- Bontempi, C., Jacquot, L., & Brand, G. (2022). A study on the relationship between odor hedonic ratings and individual odor detection threshold. *Scientific Reports*, *12*(1), 18482. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-23068-1>
- Bonzano, S., Bovetti, S., Fasolo, A., Peretto, P., & De Marchis, S. (2014). Odour enrichment increases adult-born dopaminergic neurons in the mouse olfactory bulb. *The European Journal of Neuroscience*, *40*(10), 3450–3457. <https://doi.org/10.1111/ejn.12724>
- Brand, G., & Schaal, B. (2017). L'olfaction dans les troubles dépressifs: Intérêts et perspectives. *L'Encéphale*, *43*(2), 176–182. <https://doi.org/10.1016/j.encep.2016.04.008>
- 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*(23), 7241–7252. <https://doi.org/10.1021/bi015916c>
- Briand, L., Nespoulous, C., Perez, V., Rémy, J., Huet, J., & Pernollet, J.-C. (2000). Ligand-binding properties and structural characterization of a novel rat odorant-binding protein variant. *European Journal of Biochemistry / FEBS*, *267*, 3079–3089. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.2000.01340.x>
- Buck, L., & Axel, R. (1991). A novel multigene family may encode odorant receptors: A molecular basis for odor recognition. *Cell*, *65*(1), 175–187. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(91\)90418-x](https://doi.org/10.1016/0092-8674(91)90418-x)

- Bushdid, C., Magnasco, M. O., Vosshall, L. B., & Keller, A. (2014). Humans can discriminate more than 1 trillion olfactory stimuli. *Science (New York, N.Y.)*, *343*(6177), 1370–1372.  
<https://doi.org/10.1126/science.1249168>
- Butler, M. A., Lang, N. P., Young, J. F., Caporaso, N. E., Vineis, P., Hayes, R. B., Teitel, C. H., Massengill, J. P., Lawsen, M. F., & Kadlubar, F. F. (1992). Determination of CYP1A2 and NAT2 phenotypes in human populations by analysis of caffeine urinary metabolites. *Pharmacogenetics*, *2*(3), 116–127. <https://doi.org/10.1097/00008571-199206000-00003>
- Butowt, R., Meunier, N., Bryche, B., & von Bartheld, C. (2021). The olfactory nerve is not a likely route to brain infection in COVID-19: A critical review of data from humans and animal models. *Acta Neuropathologica*, *141*, 1–14. <https://doi.org/10.1007/s00401-021-02314-2>
- Cadiou, H., Aoudé, I., Tazir, B., Molinas, A., Fenech, C., Meunier, N., & Grosmaître, X. (2014). Postnatal Odorant Exposure Induces Peripheral Olfactory Plasticity at the Cellular Level. *The Journal of Neuroscience*, *34*(14), 4857–4870. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0688-13.2014>
- Casado, B., Pannell, L. K., Iadarola, P., & Baraniuk, J. N. (2005). Identification of human nasal mucous proteins using proteomics. *Proteomics*, *5*(11), 2949–2959.  
<https://doi.org/10.1002/pmic.200401172>
- Catani, M., Dell'acqua, F., & Thiebaut de Schotten, M. (2013). A revised limbic system model for memory, emotion and behaviour. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, *37*(8), 1724–1737.  
<https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2013.07.001>
- Charra, R., Datiche, F., Casthano, A., Gigot, V., Schaal, B., & Coureaud, G. (2012). Brain processing of the mammary pheromone in newborn rabbits. *Behavioural Brain Research*, *226*(1), 179–188.  
<https://doi.org/10.1016/j.bbr.2011.09.008>

- Chen, H., & Juchau, M. R. (1998). Recombinant human glutathione S-transferases catalyse enzymic isomerization of 13-cis-retinoic acid to all-trans-retinoic acid in vitro. *The Biochemical Journal*, 336 ( Pt 1)(Pt 1), 223–226. <https://doi.org/10.1042/bj3360223>
- Chertemps, T., Younus, F., Steiner, C., Durand, N., Coppin, C. W., Pandey, G., Oakeshott, J. G., & Maïbèche, M. (2015). An antennal carboxylesterase from *Drosophila melanogaster*, esterase 6, is a candidate odorant-degrading enzyme toward food odorants. *Frontiers in Physiology*, 6, 315. <https://doi.org/10.3389/fphys.2015.00315>
- Cometto-Muñiz, J. E., Cain, W. S., & Abraham, M. H. (2003). Quantification of chemical vapors in chemosensory research. *Chemical Senses*, 28(6), 467–477. <https://doi.org/10.1093/chemse/28.6.467>
- Concha, A. R., Guest, C. M., Harris, R., Pike, T. W., Feugier, A., Zulch, H., & Mills, D. S. (2019). Canine Olfactory Thresholds to Amyl Acetate in a Biomedical Detection Scenario. *Frontiers in Veterinary Science*, 5, 345. <https://doi.org/10.3389/fvets.2018.00345>
- Coureaud, G. (2001). *La Régulation olfactive de la prise lactée chez le lapereau: Caractérisation éthologique et chimique d'un signal phéromonal* [These de doctorat, Paris 13]. <https://theses.fr/2001PA132036>
- Coureaud, G., Charra, R., Datiche, F., Sinding, C., Thomas-Danguin, T., Languille, S., Hars, B., & Schaal, B. (2010). A pheromone to behave, a pheromone to learn: The rabbit mammary pheromone. *Journal of Comparative Physiology. A, Neuroethology, Sensory, Neural, and Behavioral Physiology*, 196(10), 779–790. <https://doi.org/10.1007/s00359-010-0548-y>
- Coureaud, G., Fortun-Lamothe, L., Langlois, D., & Schaal, B. (2007). The reactivity of neonatal rabbits to the mammary pheromone as a probe for viability. *Animal*, 1(7), 1026–1032. <https://doi.org/10.1017/S1751731107000389>

- Coureaud, G., Fortun-Lamothe, L., Roedel, H., Monclús, R., & Schaal, B. (2008). Le lapereau en développement: Données comportementales, alimentaires et sensorielles sur la période naissance-sevrage. *INRAE Productions Animales*, *21*, 231–238.  
<https://doi.org/10.20870/productions-animales.2008.21.3.3395>
- Coureaud, G., Langlois, D., Sicard, G., & Schaal, B. (2004). Newborn Rabbit Responsiveness to the Mammary Pheromone is Concentration-dependent. *Chemical Senses*, *29*(4), 341–350.  
<https://doi.org/10.1093/chemse/bjh037>
- Coureaud, G., Languille, S., Joly, V., Schaal, B., & Hars, B. (2011). Independence of first- and second-order memories in newborn rabbits. *Learning & Memory (Cold Spring Harbor, N.Y.)*, *18*(6), 401–404.  
<https://doi.org/10.1101/lm.2145111>
- Coureaud, G., Moncomble, A.-S., Montigny, D., Dewas, M., Perrier, G., & Schaal, B. (2006). A Pheromone That Rapidly Promotes Learning in the Newborn. *Current Biology*, *16*(19), 1956–1961.  
<https://doi.org/10.1016/j.cub.2006.08.030>
- Coureaud, G., Schaal, B., Coudert, P., Hudson, R., Rideaud, P., & Orgeur, P. (2001a). Mimicking Natural Nursing Conditions Promotes Early Pup Survival in Domestic Rabbits. *Ethology*, *106*, 207–225.  
<https://doi.org/10.1046/j.1439-0310.2000.00521.x>
- Coureaud, G., Schaal, B., Coudert, P., Hudson, R., Rideaud, P., & Orgeur, P. (2001b). Mimicking Natural Nursing Conditions Promotes Early Pup Survival in Domestic Rabbits. *Ethology*, *106*, 207–225.  
<https://doi.org/10.1046/j.1439-0310.2000.00521.x>
- 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. *Developmental Psychobiology*, *40*(4), 372–390. <https://doi.org/10.1002/dev.10038>

- Coureaud, G., Thomas-Danguin, T., Sandoz, J.-C., & Wilson, D. A. (2022a). Biological constraints on configural odour mixture perception. *The Journal of Experimental Biology*, *225*(6), jeb242274. <https://doi.org/10.1242/jeb.242274>
- Coureaud, G., Thomas-Danguin, T., Sandoz, J.-C., & Wilson, D. A. (2022b). Biological constraints on configural odour mixture perception. *The Journal of Experimental Biology*, *225*(6). <https://doi.org/10.1242/jeb.242274>
- Coureaud, G., Thomas-Danguin, T., Wilson, D. A., & Ferreira, G. (2014). Neonatal representation of odour objects: Distinct memories of the whole and its parts. *Proceedings. Biological Sciences*, *281*(1789), 20133319. <https://doi.org/10.1098/rspb.2013.3319>
- Croy, I., Mohr, T., Weidner, K., Hummel, T., & Junge-Hoffmeister, J. (2019). Mother-child bonding is associated with the maternal perception of the child's body odor. *Physiology & Behavior*, *198*, 151–157. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2018.09.014>
- Darbro, J., Millar, J., Mcelfresh, J., & Mullens, B. (2005). Survey of Muscalure [(Z)-9-tricosene] on House Flies (Diptera: Muscidae) from Field Populations in California. *Environmental Entomology*, *34*, 1418–1425. <https://doi.org/10.1603/0046-225X-34.6.1418>
- de Andrade Carvalho, V. M., Seike Nakahara, T., & Papes, F. (2021). Investigation of Activated Mouse Olfactory Sensory Neurons via Combined Immunostaining and in situ Hybridization. *Journal of Visualized Experiments: JoVE*, *170*. <https://doi.org/10.3791/62150>
- 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. *Journal of Proteome Research*, *6*(5), 1985–1996. <https://doi.org/10.1021/pr0606575>
- DeChant, M. T., & Hall, N. J. (2021). Training with varying odor concentrations: Implications for odor detection thresholds in canines. *Animal Cognition*, *24*(4), 889–896. <https://doi.org/10.1007/s10071-021-01484-6>

- Dénes, L., Pap, Z., Szántó, A., Gergely, I., & Pop, T. S. (2015). Human vomeronasal epithelium development: An immunohistochemical overview. *Acta Microbiologica Et Immunologica Hungarica*, *62*(2), 167–181. <https://doi.org/10.1556/030.62.2015.2.7>
- Distel, H., & Hudson, R. (1985). The contribution of the olfactory and tactile modalities to the nipple-search behaviour of newborn rabbits. *Journal of Comparative Physiology. A, Sensory, Neural, and Behavioral Physiology*, *157*(5), 599–605. <https://doi.org/10.1007/BF01351354>
- Dobson, A., & Crawley, M. (1994). Pathogens and the structure of plant communities. *Trends in Ecology & Evolution*, *9*(10), 393–398. [https://doi.org/10.1016/0169-5347\(94\)90062-0](https://doi.org/10.1016/0169-5347(94)90062-0)
- Dourado, D. F. A. R., Fernandes, P. A., Mannervik, B., & Ramos, M. J. (2014). Isomerization of  $\Delta^5$ -androstene-3,17-dione into  $\Delta^4$ -androstene-3,17-dione catalyzed by human glutathione transferase A3-3: A computational study identifies a dual role for glutathione. *The Journal of Physical Chemistry. A*, *118*(31), 5790–5800. <https://doi.org/10.1021/jp410810q>
- Dubas, J., Heijkoop, M., & Aken, M. (2009). A Preliminary Investigation of Parent–Progeny Olfactory Recognition and Parental Investment. *Hum Nat*, *20*, 80–92. <https://doi.org/10.1007/s12110-009-9058-4>
- Duchamp-Viret, P., Nguyen, H. K., Maucort-Boulch, D., Remontet, L., Guyon, A., Franco, P., Cividjian, A., Thevenet, M., Iwaz, J., Galletti, S., Kassai, B., Cornaton, E., Plaisant, F., Claris, O., & Gauthier-Moulinier, H. (2021). Protocol of controlled odorant stimulation for reducing apnoeic episodes in premature newborns: A randomised open-label Latin-square study with independent evaluation of the main endpoint (PREMODEUR). *BMJ Open*, *11*(9), e047141. <https://doi.org/10.1136/bmjopen-2020-047141>
- Dussutour, A., Nicolis, S. C., Shephard, G., Beekman, M., & Sumpter, D. J. T. (2009). The role of multiple pheromones in food recruitment by ants. *Journal of Experimental Biology*, *212*(15), 2337–2348. <https://doi.org/10.1242/jeb.029827>

- Edraki, M., Pourpulad, H., Kargar, M., Pishva, N., Zare, N., & Montaseri, H. (2013). Olfactory stimulation by vanillin prevents apnea in premature newborn infants. *Iranian Journal of Pediatrics*, *23*(3), 261–268.
- Ehlers, A., These, A., Hessel, S., Preiss-Weigert, A., & Lampen, A. (2014). Active elimination of the marine biotoxin okadaic acid by P-glycoprotein through an *in vitro* gastrointestinal barrier. *Toxicology Letters*, *225*(2), 311–317. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2013.12.019>
- Endres, T., Apfelbach, R., & Fendt, M. (2005). Behavioral changes induced in rats by exposure to trimethylthiazoline, a component of fox odor. *Behavioral Neuroscience*, *119*(4), 1004–1010. <https://doi.org/10.1037/0735-7044.119.4.1004>
- Faure, P., Legendre, A., Hanser, H.-I., Andriot, I., Artur, Y., Guichard, E., Coureaud, G., & Heydel, J.-M. (2016). Odorant Metabolism Analysis by an Automated Ex Vivo Headspace Gas-Chromatography Method. *Chemical Senses*, *41*(1), 15–23. <https://doi.org/10.1093/chemse/bjv055>
- François, A., Grebert, D., Rhimi, M., Mariadassou, M., Naudon, L., Rabot, S., & Meunier, N. (2016). Olfactory epithelium changes in germfree mice. *Scientific Reports*, *6*(1), 24687. <https://doi.org/10.1038/srep24687>
- Fraser, D. (1978). Observations on the behavioural development of suckling and early-weaned piglets during the first six weeks after birth. *Animal Behaviour*, *26*, 22–30. [https://doi.org/10.1016/0003-3472\(78\)90004-0](https://doi.org/10.1016/0003-3472(78)90004-0)
- Fukano, Y. (2017). Vine tendrils use contact chemoreception to avoid conspecific leaves. *Proceedings. Biological Sciences*, *284*(1850), 20162650. <https://doi.org/10.1098/rspb.2016.2650>
- Fyfe, P. K., Westrop, G. D., Silva, A. M., Coombs, G. H., & Hunter, W. N. (2012). Leishmania TDR1 structure, a unique trimeric glutathione transferase capable of deglutathionylation and antimonial prodrug activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *109*(29), 11693–11698. <https://doi.org/10.1073/pnas.1202593109>



- Garibotti, M., Navarrini, A., Pisanelli, A. M., & Pelosi, P. (1997). Three odorant-binding proteins from rabbit nasal mucosa. *Chemical Senses*, *22*(4), 383–390.  
<https://doi.org/10.1093/chemse/22.4.383>
- Genter, M. B., Yost, G. S., & Rettie, A. E. (2006). Localization of CYP4B1 in the rat nasal cavity and analysis of CYPs as secreted proteins. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, *20*(3), 139–141. <https://doi.org/10.1002/jbt.20123>
- Getchell, M. L., Chen, Y., Ding, X., Sparks, D. L., & Getchell, T. V. (1993a). Immunohistochemical localization of a cytochrome P-450 isozyme in human nasal mucosa: Age-related trends. *The Annals of Otolaryngology, Rhinology, and Laryngology*, *102*(5), 368–374.  
<https://doi.org/10.1177/000348949310200509>
- Getchell, M. L., Chen, Y., Ding, X., Sparks, D. L., & Getchell, T. V. (1993b). Immunohistochemical localization of a cytochrome P-450 isozyme in human nasal mucosa: Age-related trends. *The Annals of Otolaryngology, Rhinology, and Laryngology*, *102*(5), 368–374.  
<https://doi.org/10.1177/000348949310200509>
- Getchell, T. V., Margolis, F. L., & Getchell, M. L. (1984). Perireceptor and receptor events in vertebrate olfaction. *Progress in Neurobiology*, *23*(4), 317–345. [https://doi.org/10.1016/0301-0082\(84\)90008-x](https://doi.org/10.1016/0301-0082(84)90008-x)
- Gomez-Diaz, C., & Benton, R. (2013). The joy of sex pheromones. *EMBO Reports*, *14*(10), 874–883.  
<https://doi.org/10.1038/embor.2013.140>
- Gradinaru, D., Suleman, F. G., Leclerc, S., Heydel, J. M., Grillasca, J. P., Magdalou, J., & Minn, A. (1999). UDP-glucuronosyltransferase in the rat olfactory bulb: Identification of the UGT1A6 isoform and age-related changes in 1-naphthol glucuronidation. *Neurochemical Research*, *24*(8), 995–1000.  
<https://doi.org/10.1023/a:1021048525012>

- Graziadei, P. P. C. (1977). Functional Anatomy of the Mammalian Chemoreceptor System. In D. Müller-Schwarze & M. M. Mozell (Eds.), *Chemical Signals in Vertebrates* (pp. 435–454). Springer US.  
[https://doi.org/10.1007/978-1-4684-2364-8\\_24](https://doi.org/10.1007/978-1-4684-2364-8_24)
- Graziadei, P. P., Levine, R. R., & Monti Graziadei, G. A. (1979). Plasticity of connections of the olfactory sensory neuron: Regeneration into the forebrain following bulbectomy in the neonatal mouse. *Neuroscience*, *4*(6), 713–727. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(79\)90002-2](https://doi.org/10.1016/0306-4522(79)90002-2)
- Green, N., Weech, M., & Walters, E. (2005). Localization and characterization of glutathione-s-transferase isozymes alpha, mu, and pi within the mouse vomeronasal organ. *Neuroscience Letters*, *375*(3), 198–202. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2004.11.037>
- Greene, M. J., & Gordon, D. M. (2003). Social insects: Cuticular hydrocarbons inform task decisions. *Nature*, *423*(6935), 32. <https://doi.org/10.1038/423032a>
- Grosmaître, X., Fuss, S. H., Lee, A. C., Adipietro, K. A., Matsunami, H., Mombaerts, P., & Ma, M. (2009). SR1, a mouse odorant receptor with an unusually broad response profile. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *29*(46), 14545–14552.  
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2752-09.2009>
- Gu, J., Su, T., Chen, Y., Zhang, Q. Y., & Ding, X. (2000). Expression of biotransformation enzymes in human fetal olfactory mucosa: Potential roles in developmental toxicity. *Toxicology and Applied Pharmacology*, *165*(2), 158–162. <https://doi.org/10.1006/taap.2000.8923>
- Guttman, N. (1959). Generalization gradients around stimuli associated with different reinforcement schedules. *Journal of Experimental Psychology*, *58*(5), 335–340.  
<https://doi.org/10.1037/h0045679>
- Guttman, N., & Kalish, H. I. (1956). Discriminability and stimulus generalization. *Journal of Experimental Psychology*, *51*(1), 79–88. <https://doi.org/10.1037/h0046219>

- Hanser, H.-I., Faure, P., Robert-Hazotte, A., Artur, Y., Duchamp-Viret, P., Coureaud, G., & Heydel, J.-M. (2017). Odorant-odorant metabolic interaction, a novel actor in olfactory perception and behavioral responsiveness. *Scientific Reports*, 7(1), 10219. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-10080-z>
- Hara, T. J. (1975). Olfaction in fish. *Progress in Neurobiology*, 5(4), 271–335. [https://doi.org/10.1016/0301-0082\(75\)90014-3](https://doi.org/10.1016/0301-0082(75)90014-3)
- Havlicek, J., & Roberts, S. C. (2009). MHC-correlated mate choice in humans: A review. *Psychoneuroendocrinology*, 34(4), 497–512. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2008.10.007>
- Hayes, J. D., Flanagan, J. U., & Jowsey, I. R. (2005). Glutathione transferases. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 45, 51–88. <https://doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.45.120403.095857>
- Hepper, P. G. (1991). An examination of fetal learning before and after birth. *The Irish Journal of Psychology*, 12(2), 95–107. <https://doi.org/10.1080/03033910.1991.10557830>
- Herz, R. S. (2016). The Role of Odor-Evoked Memory in Psychological and Physiological Health. *Brain Sciences*, 6(3), 22. <https://doi.org/10.3390/brainsci6030022>
- Heydel, J., Leclerc, S., Bernard, P., Pelczar, H., Gradinaru, D., Magdalou, J., Minn, A., Artur, Y., & Goudonnet, H. (2001). Rat olfactory bulb and epithelium UDP-glucuronosyltransferase 2A1 (UGT2A1) expression: In situ mRNA localization and quantitative analysis. *Brain Research. Molecular Brain Research*, 90(1), 83–92. [https://doi.org/10.1016/s0169-328x\(01\)00080-8](https://doi.org/10.1016/s0169-328x(01)00080-8)
- 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. *Anatomical Record (Hoboken, N.J.: 2007)*, 296(9), 1333–1345. <https://doi.org/10.1002/ar.22735>

- Heydel, J.-M., Menetrier, F., Belloir, C., Canon, F., Faure, P., Lirussi, F., Chavanne, E., Saliou, J.-M., Artur, Y., Canivenc-Lavier, M.-C., Briand, L., & Neiers, F. (2019). Characterization of rat glutathione transferases in olfactory epithelium and mucus. *PLoS ONE*, *14*(7), e0220259.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0220259>
- Hinson, J. A., Pumford, N. R., & Nelson, S. D. (1994). The role of metabolic activation in drug toxicity. *Drug Metabolism Reviews*, *26*(1–2), 395–412. <https://doi.org/10.3109/03602539409029805>
- Hirata, S., Odajima, T., Kohama, G., Ishigaki, S., & Niitsu, Y. (1992). Significance of glutathione S-transferase-pi as a tumor marker in patients with oral cancer. *Cancer*, *70*(10), 2381–2387.  
[https://doi.org/10.1002/1097-0142\(19921115\)70:10<2381::aid-cnrc2820701002>3.0.co;2-9](https://doi.org/10.1002/1097-0142(19921115)70:10<2381::aid-cnrc2820701002>3.0.co;2-9)
- Hoover, S. E. R., Keeling, C. I., Winston, M. L., & Slessor, K. N. (2003). The effect of queen pheromones on worker honey bee ovary development. *Die Naturwissenschaften*, *90*(10), 477–480.  
<https://doi.org/10.1007/s00114-003-0462-z>
- Horgue, L. F., Assens, A., Fodouliau, L., Marconi, L., Tuberosa, J., Haider, A., Boillat, M., Carleton, A., & Rodriguez, I. (2022). Transcriptional adaptation of olfactory sensory neurons to GPCR identity and activity. *Nature Communications*, *13*(1), 2929. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-30511-4>
- Hoskison, E. (2013). Olfaction, pheromones and life. *The Journal of Laryngology and Otology*, *127*, 1–4.  
<https://doi.org/10.1017/S0022215113002545>
- Hoskison, E. E. (2013). Olfaction, pheromones and life. *The Journal of Laryngology and Otology*, *127*(12), 1156–1159. <https://doi.org/10.1017/S0022215113002545>
- Hoye, T. R., Dvornikovs, V., Fine, J. M., Anderson, K. R., Jeffrey, C. S., Muddiman, D. C., Shao, F., Sorensen, P. W., & Wang, J. (2007). Details of the structure determination of the sulfated steroids PSDS and PADS: New components of the sea lamprey (*petromyzon marinus*) migratory pheromone. *The Journal of Organic Chemistry*, *72*(20), 7544–7550.  
<https://doi.org/10.1021/jo070957l>

- Hu, X. S., Ikegami, K., Vihani, A., Zhu, K. W., Zapata, M., de March, C. A., Do, M., Vaidya, N., Kucera, G., Bock, C., Jiang, Y., Yohda, M., & Matsunami, H. (2020). Concentration-Dependent Recruitment of Mammalian Odorant Receptors. *eNeuro*, 7(2), ENEURO.0103-19.2019.  
<https://doi.org/10.1523/ENEURO.0103-19.2019>
- Hudson, R., & Distel, H. (1982). The pattern of behaviour of rabbit pups in the nest. *Behaviour*, 79(2–4), 255–271. <https://doi.org/10.1163/156853982X00292>
- Hudson, R., & Distel, H. (1986). Olfactory Guidance of Nipple-Search Behaviour in Newborn Rabbits. In W. Breipohl & R. Apfelbach (Eds.), *Ontogeny of Olfaction* (pp. 243–254). Springer Berlin Heidelberg. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-71576-1\\_19](https://doi.org/10.1007/978-3-642-71576-1_19)
- Hym, C., Forma, V., Anderson, D. I., Provasi, J., Granjon, L., Huet, V., Carpe, E., Teulier, C., Durand, K., Schaal, B., & Barbu-Roth, M. (2021). Newborn crawling and rooting in response to maternal breast odor. *Developmental Science*, 24(3), e13061. <https://doi.org/10.1111/desc.13061>
- Ijichi, C., Kondo, K., Kobayashi, M., Shirasawa, A., Shimbo, K., Nakata, K., Maruyama, Y., Ihara, Y., Kawato, Y., Mannen, T., Takeshita, R., Kikuchi, Y., Saito, Y., & Yamasoba, T. (2022). Lipocalin 15 in the olfactory mucus is a biomarker for Bowman’s gland activity. *Scientific Reports*, 12(1), 9984. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-13464-y>
- Ijichi, C., Wakabayashi, H., Sugiyama, S., Ihara, Y., Nogi, Y., Nagashima, A., Ihara, S., Niimura, Y., Shimizu, Y., Kondo, K., & Touhara, K. (2019). Metabolism of Odorant Molecules in Human Nasal/Oral Cavity Affects the Odorant Perception. *Chemical Senses*, 44(7), 465–481. <https://doi.org/10.1093/chemse/bjz041>
- Jakobsson, P.-J., Morgenstern, R., Mancini, J., Ford-Hutchinson, A., & Persson, B. (1999). Common structural features of MAPEG— A widespread superfamily of membrane associated proteins with highly divergent functions in eicosanoid and glutathione metabolism. *Protein Science*, 8(3), 689–692. <https://doi.org/10.1110/ps.8.3.689>

- Jessen, S. (2020). Maternal odor reduces the neural response to fearful faces in human infants. *Developmental Cognitive Neuroscience, 45*, 100858. <https://doi.org/10.1016/j.dcn.2020.100858>
- Jouhanneau, M., Schaal, B., & Coureaud, G. (2016). Mammary pheromone-induced odour learning influences sucking behaviour and milk intake in the newborn rabbit. *Animal Behaviour, 111*, 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.anbehav.2015.10.003>
- Kaissling, K.-E. (2014). *Pheromone Reception in Insects* (pp. 99–146). <https://doi.org/10.1201/b16511-5>
- Kanbur, B. N., & Balci, S. (2020). Impact of the odors of vanilla extract and breast milk on the frequency of apnea in preterm neonates. *Japan Journal of Nursing Science: JJNS, 17*(1), e12271. <https://doi.org/10.1111/jjns.12271>
- Kass, M. D., Guang, S. A., Moberly, A. H., & McGann, J. P. (2016). Changes in Olfactory Sensory Neuron Physiology and Olfactory Perceptual Learning After Odorant Exposure in Adult Mice. *Chemical Senses, 41*(2), 123–133. <https://doi.org/10.1093/chemse/bjv065>
- Keller, A., Zhuang, H., Chi, Q., Vosshall, L. B., & Matsunami, H. (2007). Genetic variation in a human odorant receptor alters odour perception. *Nature, 449*(7161), 468–472. <https://doi.org/10.1038/nature06162>
- Ketterer, B., Coles, B., & Meyer, D. J. (1983). The role of glutathione in detoxication. *Environmental Health Perspectives, 49*, 59–69.
- Khuda-Bukhsh, A. R. (2003). Towards understanding molecular mechanisms of action of homeopathic drugs: An overview. *Molecular and Cellular Biochemistry, 253*(1–2), 339–345. <https://doi.org/10.1023/a:1026048907739>
- Kia'i, N., & Bajaj, T. (2024). Histology, Respiratory Epithelium. In *StatPearls*. StatPearls Publishing. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK541061/>
- Kida, H., Fukutani, Y., Mainland, J. D., de March, C. A., Vihani, A., Li, Y. R., Chi, Q., Toyama, A., Liu, L., Kameda, M., Yohda, M., & Matsunami, H. (2018). Vapor detection and discrimination with a

- panel of odorant receptors. *Nature Communications*, 9, 4556. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-06806-w>
- Krestel, D., Passe, D., Smith, J. C., & Jonsson, L. (1984). Behavioral determination of olfactory thresholds to amyl acetate in dogs. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 8(2), 169–174. [https://doi.org/10.1016/0149-7634\(84\)90037-x](https://doi.org/10.1016/0149-7634(84)90037-x)
- Krishna, N. S., Getchell, T. V., & Getchell, M. L. (1994). Differential expression of alpha, mu, and pi classes of glutathione S-transferases in chemosensory mucosae of rats during development. *Cell and Tissue Research*, 275(3), 435–450. <https://doi.org/10.1007/BF00318813>
- Kulkarni-Narla, A., Getchell, T. V., & Getchell, M. L. (1997). Differential expression of manganese and copper-zinc superoxide dismutases in the olfactory and vomeronasal receptor neurons of rats during ontogeny. *The Journal of Comparative Neurology*, 381(1), 31–40. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1096-9861\(19970428\)381:1<31::aid-cne3>3.0.co;2-l](https://doi.org/10.1002/(sici)1096-9861(19970428)381:1<31::aid-cne3>3.0.co;2-l)
- Larsson, L., & Laska, M. (2011). Ultra-high olfactory sensitivity for the human sperm-attractant aromatic aldehyde bourgeonal in CD-1 mice. *Neuroscience Research*, 71(4), 355–360. <https://doi.org/10.1016/j.neures.2011.08.009>
- Laska, M., Fendt, M., Wieser, A., Endres, T., Hernandez Salazar, L. T., & Apfelbach, R. (2005). Detecting danger--or just another odorant? Olfactory sensitivity for the fox odor component 2,4,5-trimethylthiazoline in four species of mammals. *Physiology & Behavior*, 84(2), 211–215. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2004.11.006>
- Laska, M., & Ringh, A. (2010). How big is the gap between olfactory detection and recognition of aliphatic aldehydes? *Attention, Perception & Psychophysics*, 72(3), 806–812. <https://doi.org/10.3758/APP.72.3.806>

- Lazard, D., Zupko, K., Poria, Y., Nef, P., Lazarovits, J., Horn, S., Khen, M., & Lancet, D. (1991). Odorant signal termination by olfactory UDP glucuronosyl transferase. *Nature*, *349*(6312), 790–793. <https://doi.org/10.1038/349790a0>
- Leclerc, S., Heydel, J.-M., Amossé, V., Gradinaru, D., Cattarelli, M., Artur, Y., Goudonnet, H., Magdalou, J., Netter, P., Pelczar, H., & Minn, A. (2002). Glucuronidation of odorant molecules in the rat olfactory system: Activity, expression and age-linked modifications of UDP-glucuronosyltransferase isoforms, UGT1A6 and UGT2A1, and relation to mitral cell activity. *Brain Research. Molecular Brain Research*, *107*(2), 201–213. [https://doi.org/10.1016/s0169-328x\(02\)00455-2](https://doi.org/10.1016/s0169-328x(02)00455-2)
- Legendre, A., Faure, P., Tiesset, H., Potin, C., Jakob, I., Sicard, G., Schaal, B., Artur, Y., Coureaud, G., & Heydel, J.-M. (2014). When the nose must remain responsive: Glutathione conjugation of the mammary pheromone in the newborn rabbit. *Chemical Senses*, *39*(5), 425–437. <https://doi.org/10.1093/chemse/bju013>
- Lévy, F., Keller, M., & Poindron, P. (2004). Olfactory regulation of maternal behavior in mammals. *Hormones and Behavior*, *46*(3), 284–302. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2004.02.005>
- Li, G.-W., Chen, X.-L., Xu, X.-L., & Wu, J.-X. (2018). Degradation of sex pheromone and plant volatile components by an antennal glutathione S-transferase in the oriental fruit moth, *Grapholita molesta* Busck (Lepidoptera: Tortricidae). *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, *99*(4), e21512. <https://doi.org/10.1002/arch.21512>
- Li, Q., & Liberles, S. D. (2015). Aversion and attraction through olfaction. *Current Biology: CB*, *25*(3), R120–R129. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2014.11.044>
- Liang, F. (2020). Sustentacular Cell Enwrapment of Olfactory Receptor Neuronal Dendrites: An Update. *Genes*, *11*(5), 493. <https://doi.org/10.3390/genes11050493>



- Ling, G., Gu, J., Genter, M. B., Zhuo, X., & Ding, X. (2004a). Regulation of cytochrome P450 gene expression in the olfactory mucosa. *Chemico-Biological Interactions*, *147*(3), 247–258.  
<https://doi.org/10.1016/j.cbi.2004.02.003>
- Ling, G., Gu, J., Genter, M. B., Zhuo, X., & Ding, X. (2004b). Regulation of cytochrome P450 gene expression in the olfactory mucosa. *Chemico-Biological Interactions*, *147*(3), 247–258.  
<https://doi.org/10.1016/j.cbi.2004.02.003>
- Litwack, G., Ketterer, B., & Arias, I. M. (1971). Ligandin: A hepatic protein which binds steroids, bilirubin, carcinogens and a number of exogenous organic anions. *Nature*, *234*(5330), 466–467.  
<https://doi.org/10.1038/234466a0>
- Liu, Y.-J., Han, X.-M., Ren, L.-L., Yang, H.-L., & Zeng, Q.-Y. (2013). Functional divergence of the glutathione S-transferase supergene family in *Physcomitrella patens* reveals complex patterns of large gene family evolution in land plants. *Plant Physiology*, *161*(2), 773–786.  
<https://doi.org/10.1104/pp.112.205815>
- Löbel, D., Jacob, M., Völkner, M., & Breer, H. (2002). Odorants of different chemical classes interact with distinct odorant binding protein subtypes. *Chemical Senses*, *27*(1), 39–44.  
<https://doi.org/10.1093/chemse/27.1.39>
- 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. *Current Biology: CB*, *22*(21), 1998–2007. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2012.08.041>
- Loos, H., Doucet, S., Soussignan, R., Sharapa (Hartmann), C., Durand, K., Dittrich, R., Sagot, P., Buettner, A., & Schaal, B. (2014). Responsiveness of Human Neonates to the Odor of 5 -Androst-16-en-3-one: A Behavioral Paradox? *Chemical Senses*, *39*, 693–703.  
<https://doi.org/10.1093/chemse/bju041>

- Maresh, A., Rodriguez Gil, D., Whitman, M. C., & Greer, C. A. (2008). Principles of glomerular organization in the human olfactory bulb—Implications for odor processing. *PloS One*, 3(7), e2640. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0002640>
- Marin, M. M., Rapisardi, G., & Tani, F. (2015). Two-day-old newborn infants recognise their mother by her axillary odour. *Acta Paediatrica (Oslo, Norway: 1992)*, 104(3), 237–240. <https://doi.org/10.1111/apa.12905>
- Massberg, D., & Hatt, H. (2018). Human Olfactory Receptors: Novel Cellular Functions Outside of the Nose. *Physiological Reviews*, 98, 1739–1763. <https://doi.org/10.1152/physrev.00013.2017>
- Matsuo, T., Rossier, D. A., Kan, C., & Rodriguez, I. (2012). The wiring of Grueneberg ganglion axons is dependent on neuropilin 1. *Development (Cambridge, England)*, 139(15), 2783–2791. <https://doi.org/10.1242/dev.077008>
- Mayer, U., Küller, A., Daiber, P. C., Neudorf, I., Warnken, U., Schnölzer, M., Frings, S., & Möhrlen, F. (2009). The proteome of rat olfactory sensory cilia. *Proteomics*, 9(2), 322–334. <https://doi.org/10.1002/pmic.200800149>
- Mazari, A. M. A., Zhang, L., Ye, Z.-W., Zhang, J., Tew, K. D., & Townsend, D. M. (2023). The Multifaceted Role of Glutathione S-Transferases in Health and Disease. *Biomolecules*, 13(4), 688. <https://doi.org/10.3390/biom13040688>
- Mermet, N., Coureaud, G., McGrane, S., & Schaal, B. (2007). Odour-guided social behaviour in newborn and young cats: An analytical survey. *Chemoecology*, 17(4), 187–199. <https://doi.org/10.1007/s00049-007-0384-x>
- Miller, S. S., & Spear, N. E. (2009). Olfactory learning in the rat immediately after birth: Unique salience of first odors. *Developmental Psychobiology*, 51(6), 488–504. <https://doi.org/10.1002/dev.20388>
- Minn, A.-L., Pelczar, H., Denizot, C., Martinet, M., Heydel, J.-M., Walther, B., Minn, A., Goudonnet, H., & Artur, Y. (2005). Characterization of microsomal cytochrome P450-dependent monooxygenases

- in the rat olfactory mucosa. *Drug Metabolism and Disposition: The Biological Fate of Chemicals*, 33(8), 1229–1237. <https://doi.org/10.1124/dmd.105.004085>
- Miragall, F., Breipohl, W., Naguro, T., & Voss-Wermbter, G. (1984). Freeze-fracture study of the plasma membranes of the septal olfactory organ of Maseru. *Journal of Neurocytology*, 13(1), 111–125. <https://doi.org/10.1007/BF01148321>
- Miyawaki, A., Homma, H., Tamura, H., Matsui, M., & Mikoshiba, K. (1996). Zonal distribution of sulfotransferase for phenol in olfactory sustentacular cells. *The EMBO Journal*, 15(9), 2050–2055.
- Moncomble, A.-S., Coureaud, G., Quenedey, B., Langlois, D., Perrier, G., & Schaal, B. (2005). The mammary pheromone of the rabbit: From where does it come? *Animal Behaviour*, 69, 29–38. <https://doi.org/10.1016/j.anbehav.2004.05.006>
- Moran, D. T., Rowley, J. C., & Jafek, B. W. (1982). Electron microscopy of human olfactory epithelium reveals a new cell type: The microvillar cell. *Brain Research*, 253(1–2), 39–46. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(82\)90671-0](https://doi.org/10.1016/0006-8993(82)90671-0)
- Morrison, E. E., & Costanzo, R. M. (1990). Morphology of the human olfactory epithelium. *The Journal of Comparative Neurology*, 297(1), 1–13. <https://doi.org/10.1002/cne.902970102>
- Morrison, E. E., & Costanzo, R. M. (1992). Morphology of olfactory epithelium in humans and other vertebrates. *Microscopy Research and Technique*, 23(1), 49–61. <https://doi.org/10.1002/jemt.1070230105>
- Mota-Rojas, D., Bienboire-Frosini, C., Marcet-Rius, M., Domínguez-Oliva, A., Mora-Medina, P., Lezama-García, K., & Orihuela, A. (2022). Mother-young bond in non-human mammals: Neonatal communication pathways and neurobiological basis. *Frontiers in Psychology*, 13, 1064444. <https://doi.org/10.3389/fpsyg.2022.1064444>

- Müller, F., & O’Rahilly, R. (1989). The human brain at stage 16, including the initial evagination of the neurohypophysis. *Anatomy and Embryology*, *179*(6), 551–569.  
<https://doi.org/10.1007/BF00315698>
- Mykutowycz, R. (1968). Territorial marking by rabbits. *Scientific American*, *218*(5), 116–126.  
<https://doi.org/10.1038/scientificamerican0568-116>
- Nagashima, A., & Touhara, K. (2010). Enzymatic conversion of odorants in nasal mucus affects olfactory glomerular activation patterns and odor perception. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *30*(48), 16391–16398.  
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2527-10.2010>
- Negróni, J., Meunier, N., Monnerie, R., Salesse, R., Baly, C., Caillol, M., & Congar, P. (2012). Neuropeptide Y Enhances Olfactory Mucosa Responses to Odorant in Hungry Rats. *PLoS One*, *7*, e45266. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0045266>
- Neiers, F., Jarriault, D., Menetrier, F., Faure, P., Briand, L., & Heydel, J.-M. (2021). The odorant metabolizing enzyme UGT2A1: Immunolocalization and impact of the modulation of its activity on the olfactory response. *PLoS One*, *16*(3), e0249029.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0249029>
- Nelson, W. G., De Marzo, A. M., & DeWeese, T. L. (2001). The molecular pathogenesis of prostate cancer: Implications for prostate cancer prevention. *Urology*, *57*(4 Suppl 1), 39–45.  
[https://doi.org/10.1016/s0090-4295\(00\)00939-0](https://doi.org/10.1016/s0090-4295(00)00939-0)
- Neuhaus, E. M., Zhang, W., Gelis, L., Deng, Y., Noldus, J., & Hatt, H. (2009). Activation of an olfactory receptor inhibits proliferation of prostate cancer cells. *The Journal of Biological Chemistry*, *284*(24), 16218–16225. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.012096>

- Niimura, Y. (2012). Olfactory receptor multigene family in vertebrates: From the viewpoint of evolutionary genomics. *Current Genomics*, *13*(2), 103–114.  
<https://doi.org/10.2174/138920212799860706>
- 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. *Neuroscience Research*, *63*(1), 66–71. <https://doi.org/10.1016/j.neures.2008.10.007>
- Nowak, R., Murphy, T. M., Lindsay, D. R., Alster, P., Andersson, R., & Uvnäs-Moberg, K. (1997). Development of a preferential relationship with the mother by the newborn lamb: Importance of the sucking activity. *Physiology & Behavior*, *62*(4), 681–688. [https://doi.org/10.1016/s0031-9384\(97\)00079-6](https://doi.org/10.1016/s0031-9384(97)00079-6)
- Okamoto, M., Shirasu, M., Fujita, R., Hirasawa, Y., & Touhara, K. (2016). Child Odors and Parenting: A Survey Examination of the Role of Odor in Child-Rearing. *PloS One*, *11*(5), e0154392.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0154392>
- Orecchioni, M., Kobiyama, K., Winkels, H., Ghosheh, Y., McArdle, S., Mikulski, Z., Kiosses, W. B., Fan, Z., Wen, L., Jung, Y., Roy, P., Ali, A. J., Miyamoto, Y., Mangan, M., Makings, J., Wang, Z., Denn, A., Vallejo, J., Owens, M., ... Ley, K. (2022). Olfactory receptor 2 in vascular macrophages drives atherosclerosis by NLRP3-dependent IL-1 production. *Science (New York, N.Y.)*, *375*(6577), 214–221. <https://doi.org/10.1126/science.abg3067>
- Paës, C., Fortun-Lamothe, L., Coureaud, G., Bébin, K., Duperray, J., Gohier, C., Guené-Grand, E., Rebours, G., Aymard, P., Bannelier, C., Debrusse, A., Gidenne, T., & Combes, S. (2020). Insights into suckling rabbit feeding behaviour: Acceptability of different creep feed presentations and attractiveness for sensory feed additives. *Animal*, *14*(8), 1629–1637.  
<https://doi.org/10.1017/S1751731120000038>

- Parmentier, M., Libert, F., Schurmans, S., Schiffmann, S., Lefort, A., Eggerickx, D., Ledent, C., Mollereau, C., Gérard, C., & Perret, J. (1992). Expression of members of the putative olfactory receptor gene family in mammalian germ cells. *Nature*, *355*(6359), 453–455.  
<https://doi.org/10.1038/355453a0>
- Pedersen, P. E., & Blass, E. M. (1982). Prenatal and postnatal determinants of the 1st suckling episode in albino rats. *Developmental Psychobiology*, *15*(4), 349–355.  
<https://doi.org/10.1002/dev.420150407>
- Pelosi, P., Baldaccini, N. E., & Pisanelli, A. M. (1982). Identification of a specific olfactory receptor for 2-isobutyl-3-methoxy-pyrazine. *Biochemical Journal*, *201*(1), 245–248.
- Pemble, S. E., Wardle, A. F., & Taylor, J. B. (1996). Glutathione S-transferase class Kappa: Characterization by the cloning of rat mitochondrial GST and identification of a human homologue. *Biochemical Journal*, *319*(Pt 3), 749–754.
- Philippe Roi, T. G. (2013). *Analogie entre la comptabilité et le système olfactif (Analogy between Accounting and the Olfactory System)* (pp. 69-82 et sa bibliographie).
- Porter, R. H., Cernoch, J. M., & McLaughlin, F. J. (1983). Maternal recognition of neonates through olfactory cues. *Physiology & Behavior*, *30*(1), 151–154. [https://doi.org/10.1016/0031-9384\(83\)90051-3](https://doi.org/10.1016/0031-9384(83)90051-3)
- Porter, R. H., & Winberg, J. (1999). Unique salience of maternal breast odors for newborn infants. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, *23*(3), 439–449. [https://doi.org/10.1016/s0149-7634\(98\)00044-x](https://doi.org/10.1016/s0149-7634(98)00044-x)
- Raihani, G., González, D., Arteaga, L., & Hudson, R. (2009). Olfactory guidance of nipple attachment and suckling in kittens of the domestic cat: Inborn and learned responses. *Developmental Psychobiology*, *51*(8), 662–671. <https://doi.org/10.1002/dev.20401>

- Rajendran, E. S. (2015). *An evaluation of Avogadro's number in the light of HRTEM and EDS studies of high dilutions of Ferrum metallicum 6, 30, 200, 1M, 10M and 50Mc. 14, 3–9.*
- Reddy, G., Zak, J. D., Vergassola, M., & Murthy, V. N. (2018). Antagonism in olfactory receptor neurons and its implications for the perception of odor mixtures. *eLife, 7*, e34958.  
<https://doi.org/10.7554/eLife.34958>
- Rehman, I., Mahabadi, N., Sanvictores, T., & Rehman, C. I. (2024). Classical Conditioning. In *StatPearls*. StatPearls Publishing. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK470326/>
- Reid, C. R., Latty, T., Dussutour, A., & Beekman, M. (2012). Slime mold uses an externalized spatial “memory” to navigate in complex environments. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 109*(43), 17490–17494.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.1215037109>
- Reinemer, P., Dirr, H. W., Ladenstein, R., Schäffer, J., Gallay, O., & Huber, R. (1991). The three-dimensional structure of class pi glutathione S-transferase in complex with glutathione sulfonate at 2.3 Å resolution. *The EMBO Journal, 10*(8), 1997–2005. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1991.tb07729.x>
- Riddiford, L. M. (1967). Trans-2-hexenal: Mating stimulant for polyphemus moths. *Science (New York, N.Y.), 158*(3797), 139–141. <https://doi.org/10.1126/science.158.3797.139>
- Rihani, K., Gonzalez, D., Neiers, F., Poirier, N., Fraichard, S., Ferveur, J.-F., & Briand, L. (2017, November 7). *The implication of OBP28a in <em>Drosophila melanogaster</em> chemosensory perception*. 31. French Drosophila Meeting (FDM 2017). <https://hal.inrae.fr/hal-02785694>
- Robert-Hazotte, A., Faure, P., Ménétrier, F., Folia, M., Schwartz, M., Quéré, J.-L. L., Neiers, F., Thomas-Danguin, T., & Heydel, J.-M. (2022). Nasal Odorant Competitive Metabolism Is Involved in the Human Olfactory Process. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 70*(27), 8385.  
<https://doi.org/10.1021/acs.jafc.2c02720>

- Robert-Hazotte, A., Faure, P., Neiers, F., Potin, C., Artur, Y., Coureaud, G., & Heydel, J.-M. (2019). Publisher Correction: Nasal mucus glutathione transferase activity and impact on olfactory perception and neonatal behavior. *Scientific Reports*, *9*(1), 8111. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-44135-0>
- Röder, A., Hüsken, S., Hutter, M. C., Rettie, A. E., Hanenberg, H., Wiek, C., & Girhard, M. (2023). Spotlight on CYP4B1. *International Journal of Molecular Sciences*, *24*(3), 2038. <https://doi.org/10.3390/ijms24032038>
- Rogers, M. E., Jani, M. K., & Vogt, R. G. (1999). An olfactory-specific glutathione-S-transferase in the sphinx moth *Manduca sexta*. *The Journal of Experimental Biology*, *202*(Pt 12), 1625–1637. <https://doi.org/10.1242/jeb.202.12.1625>
- Romagny, S., Coureaud, G., & Thomas-Danguin, T. (2018). Key odorants or key associations? Insights into elemental and configural odour processing. *Flavour and Fragrance Journal*, *33*. <https://doi.org/10.1002/ffj.3429>
- Royet, J. P., Distel, H., Hudson, R., & Gervais, R. (1998). A re-estimation of the number of glomeruli and mitral cells in the olfactory bulb of rabbit. *Brain Research*, *788*(1–2), 35–42. [https://doi.org/10.1016/s0006-8993\(97\)01504-7](https://doi.org/10.1016/s0006-8993(97)01504-7)
- Saito, H., Chi, Q., Zhuang, H., Matsunami, H., & Mainland, J. D. (2009). Odor coding by a Mammalian receptor repertoire. *Science Signaling*, *2*(60), ra9. <https://doi.org/10.1126/scisignal.2000016>
- Sato, A., Nakagawasai, O., Tan-No, K., Onogi, H., Niiijima, F., & Tadano, T. (2010). Influence of olfactory bulbectomy on maternal behavior and dopaminergic function in nucleus accumbens in mice. *Behavioural Brain Research*, *215*(1), 141–145. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2010.07.012>
- Schaal, B., Coureaud, G., Langlois, D., Giniès, C., Sémon, E., & Perrier, G. (2003). Chemical and behavioural characterization of the rabbit mammary pheromone. *Nature*, *424*(6944), 68–72. <https://doi.org/10.1038/nature01739>



- Schaal, B., Orgeur, P., & Arnould, C. (1995). Olfactory Preferences in Newborn Lambs: Possible Influence of Prenatal Experience. *Behaviour*, *132*(5/6), 351–365.
- Schilling, B., Kaiser, R., Natsch, A., & Gautschi, M. (2010). Investigation of odors in the fragrance industry. *Chemoecology*, *20*, 135–147. <https://doi.org/10.1007/s00049-009-0035-5>
- Schwartz, M., Boichot, V., Muradova, M., Fournier, P., Senet, P., Nicolai, A., Canon, F., Lirussi, F., Ladeira, R., Maibeche, M., Chertemps, T., Aubert, E., Didierjean, C., & Neiers, F. (2023). Structure-activity analysis suggests an olfactory function for the unique antennal delta glutathione transferase of *Apis mellifera*. *FEBS Letters*, *597*(24), 3038–3048. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.14770>
- Schwartz, M., Menetrier, F., Heydel, J.-M., Chavanne, E., Faure, P., Labrousse, M., Lirussi, F., Canon, F., Mannervik, B., Briand, L., & Neiers, F. (2020). Interactions Between Odorants and Glutathione Transferases in the Human Olfactory Cleft. *Chemical Senses*, *45*(8), 645–654. <https://doi.org/10.1093/chemse/bjaa055>
- Seo, J. H., Pyo, S., Shin, Y.-K., Nam, B.-G., Kang, J. W., Kim, K. P., Lee, H. Y., & Cho, S.-R. (2018). The Effect of Environmental Enrichment on Glutathione-Mediated Xenobiotic Metabolism and Antioxidation in Normal Adult Mice. *Frontiers in Neurology*, *9*, 425. <https://doi.org/10.3389/fneur.2018.00425>
- Sharma, A., Saha, B. K., Kumar, R., & Varadwaj, P. K. (2021). OlfactionBase: A repository to explore odors, odorants, olfactory receptors and odorant–receptor interactions. *Nucleic Acids Research*, *50*(D1), D678–D686. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab763>
- Shepard, R. N. (1987). Toward a universal law of generalization for psychological science. *Science*, *237*(4820), 1317–1323. <https://doi.org/10.1126/science.3629243>
- Shepherd, G. M. (2005). Perception without a thalamus how does olfaction do it? *Neuron*, *46*(2), 166–168. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2005.03.012>

- Shepherd, G. M. (2007). Perspectives on olfactory processing, conscious perception, and orbitofrontal cortex. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1121, 87–101.  
<https://doi.org/10.1196/annals.1401.032>
- Shepherd, G. M. (2010). New Perspectives on Olfactory Processing and Human Smell. In A. Menini (Ed.), *The Neurobiology of Olfaction*. CRC Press/Taylor & Francis.  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK55977/>
- Shirasu, M., & Touhara, K. (2011). The scent of disease: Volatile organic compounds of the human body related to disease and disorder. *Journal of Biochemistry*, 150(3), 257–266.  
<https://doi.org/10.1093/jb/mvr090>
- Shorter, J. R., Dembeck, L. M., Everett, L. J., Morozova, T. V., Arya, G. H., Turlapati, L., St Armour, G. E., Schal, C., Mackay, T. F. C., & Anholt, R. R. H. (2016). Obp56h Modulates Mating Behavior in *Drosophila melanogaster*. *G3 (Bethesda, Md.)*, 6(10), 3335–3342.  
<https://doi.org/10.1534/g3.116.034595>
- Shu, C.-H., Yuan, B.-C., Lin, S.-H., & Lin, C.-Z. (2007). Cross-cultural application of the “Sniffin’ Sticks” odor identification test. *American Journal of Rhinology*, 21(5), 570–573.  
<https://doi.org/10.2500/ajr.2007.21.3075>
- Sinning, I., Kleywegt, G. J., Cowan, S. W., Reinemer, P., Dirr, H. W., Huber, R., Gilliland, G. L., Armstrong, R. N., Ji, X., & Board, P. G. (1993). Structure determination and refinement of human alpha class glutathione transferase A1-1, and a comparison with the Mu and Pi class enzymes. *Journal of Molecular Biology*, 232(1), 192–212. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1993.1376>
- Sreng, L., Temime-Roussel, B., Wortham, H., & Mourre, C. (2017). Chemical Identification of “Maternal Signature Odors” in Rat. *Chemical Senses*. <https://doi.org/10.1093/chemse/bjw124>
- Steiner, C., Bozzolan, F., Montagné, N., Maïbèche, M., & Chertemps, T. (2017). Neofunctionalization of “Juvenile Hormone Esterase Duplication” in *Drosophila* as an odorant-degrading enzyme

towards food odorants. *Scientific Reports*, 7(1), 12629. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-13015-w>

Stella, L., Pallottini, V., Moreno, S., Leoni, S., De Maria, F., Turella, P., Federici, G., Fabrini, R., Dawood, K.

F., Bello, M. L., Pedersen, J. Z., & Ricci, G. (2007). Electrostatic association of glutathione transferase to the nuclear membrane. Evidence of an enzyme defense barrier at the nuclear envelope. *The Journal of Biological Chemistry*, 282(9), 6372–6379.

<https://doi.org/10.1074/jbc.M609906200>

Strazielle, N., & Ghersi-Egea, J.-F. (2000). Choroid Plexus in the Central Nervous System: Biology and

Physiopathology. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*, 59(7), 561–574.

<https://doi.org/10.1093/jnen/59.7.561>

Sullivan, R. M., Hofer, M. A., & Brake, S. C. (1986). Olfactory-guided orientation in neonatal rats is

enhanced by a conditioned change in behavioral state. *Developmental Psychobiology*, 19(6),

615–623. <https://doi.org/10.1002/dev.420190612>

Sullivan, R. M., & Toubas, P. (1998). Clinical usefulness of maternal odor in newborns: Soothing and

feeding preparatory responses. *Biology of the Neonate*, 74(6), 402–408.

<https://doi.org/10.1159/000014061>

Tabuchi, M., Sakurai, T., Mitsuno, H., Namiki, S., Minegishi, R., Shiotsuki, T., Uchino, K., Sezutsu, H.,

Tamura, T., Haupt, S. S., Nakatani, K., & Kanzaki, R. (2013). Pheromone responsiveness threshold depends on temporal integration by antennal lobe projection neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(38), 15455–15460.

<https://doi.org/10.1073/pnas.1313707110>

Takaoka, N., Sanoh, S., Ohta, S., Esmaeeli, M., Leimkühler, S., Kurosaki, M., Terao, M., Garattini, E., &

Kotake, Y. (2022). Involvement of aldehyde oxidase in the metabolism of aromatic and aliphatic

- aldehyde-odorants in the mouse olfactory epithelium. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, *715*, 109099. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2021.109099>
- Tamura, Y., Kataoka, Y., Cui, Y., Takamori, Y., Watanabe, Y., & Yamada, H. (2007). Intracellular translocation of glutathione S-transferase pi during oligodendrocyte differentiation in adult rat cerebral cortex in vivo. *Neuroscience*, *148*(2), 535–540. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2007.06.026>
- Tan, H. M., & Low, W. Y. (2018). Rapid birth-death evolution and positive selection in detoxification-type glutathione S-transferases in mammals. *PLoS One*, *13*(12), e0209336. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0209336>
- Tegoni, M., Campanacci, V., & Cambillau, C. (2004). Structural aspects of sexual attraction and chemical communication in insects. *Trends in Biochemical Sciences*, *29*(5), 257–264. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2004.03.003>
- Teicher, M. H., & Blass, E. M. (1977). First suckling response of the newborn albino rat: The roles of olfaction and amniotic fluid. *Science*, *198*(4317), 635–636. <https://doi.org/10.1126/science.918660>
- Teulier, L., Dégletagne, C., Rey, B., Tornos, J., Keime, C., de Dinechin, M., Raccurt, M., Rouanet, J.-L., Roussel, D., & Duchamp, C. (2012). Selective upregulation of lipid metabolism in skeletal muscle of foraging juvenile king penguins: An integrative study. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, *279*(1737), 2464–2472. <https://doi.org/10.1098/rspb.2011.2664>
- Thiebaud, N., Menetrier, F., Belloir, C., Minn, A.-L., Neiers, F., Artur, Y., Le Bon, A.-M., & Heydel, J.-M. (2011). Expression and differential localization of xenobiotic transporters in the rat olfactory neuro-epithelium. *Neuroscience Letters*, *505*(2), 180–185. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2011.10.018>

- Thiebaud, N., Sigoillot, M., Chevalier, J., Artur, Y., Heydel, J.-M., & Le Bon, A.-M. (2010). Effects of typical inducers on olfactory xenobiotic-metabolizing enzyme, transporter, and transcription factor expression in rats. *Drug Metabolism and Disposition: The Biological Fate of Chemicals*, *38*(10), 1865–1875. <https://doi.org/10.1124/dmd.110.035014>
- Thiebaud, N., Veloso Da Silva, S., Jakob, I., Sicard, G., Chevalier, J., Ménétrier, F., Berdeaux, O., Artur, Y., Heydel, J.-M., & Le Bon, A.-M. (2013). Odorant Metabolism Catalyzed by Olfactory Mucosal Enzymes Influences Peripheral Olfactory Responses in Rats. *PLoS ONE*, *8*(3), e59547. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0059547>
- Thomas-Danguin, T., Sinding, C., Romagny, S., El Mountassir, F., Atanasova, B., Le Berre, E., Le Bon, A.-M., & Coureaud, G. (2014). The perception of odor objects in everyday life: A review on the processing of odor mixtures. *Frontiers in Psychology*, *5*. <https://doi.org/10.3389/fpsyg.2014.00504>
- Urbani, G., Distrutti, E., Biagioli, M., Marchiano, S., & Fiorucci, S. (2022). How smell regulates metabolism: The role of ectopically expressed olfactory receptors in lipid and glucose homeostasis. *Journal of Translational Science*, *7*. <https://doi.org/10.15761/JTS.1000470>
- Varendi, H., Porter, R. H., & Winberg, J. (1994). Does the newborn baby find the nipple by smell? *Lancet (London, England)*, *344*(8928), 989–990. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(94\)91645-4](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(94)91645-4)
- Verma, A. K., Zheng, J., Meyerholz, D. K., & Perlman, S. (2022). SARS-CoV-2 infection of sustentacular cells disrupts olfactory signaling pathways. *JCI Insight*, *7*(24), e160277. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.160277>
- Vernier, C. L., Krupp, J. J., Marcus, K., Hefetz, A., Levine, J. D., & Ben-Shahar, Y. (n.d.). The cuticular hydrocarbon profiles of honey bee workers develop via a socially-modulated innate process. *eLife*, *8*, e41855. <https://doi.org/10.7554/eLife.41855>

- Vidic, J., Grosclaude, J., Monnerie, R., Persuy, M.-A., Badonnel, K., Baly, C., Caillol, M., Briand, L., Salesse, R., & Pajot-Augy, E. (2008). On a chip demonstration of a functional role for Odorant Binding Protein in the preservation of olfactory receptor activity at high odorant concentration. *Lab on a Chip*, 8(5), 678–688. <https://doi.org/10.1039/b717724k>
- Wackermannová, M., Pinc, L., & Jebavý, L. (2016). Olfactory sensitivity in mammalian species. *Physiological Research*, 65(3), 369–390. <https://doi.org/10.33549/physiolres.932955>
- Walker, D., Walker, J., Cavnar, P., Taylor, J., Pickel, D., Hall, S., & Suarez, J. (2006). Naturalistic quantification of canine olfactory sensitivity. *Applied Animal Behaviour Science - APPL ANIM BEHAV SCI*, 97, 241–254. <https://doi.org/10.1016/j.applanim.2005.07.009>
- Wang, T., Arifoglu, P., Ronai, Z., & Tew, K. D. (2001). Glutathione S-transferase P1-1 (GSTP1-1) inhibits c-Jun N-terminal kinase (JNK1) signaling through interaction with the C terminus. *The Journal of Biological Chemistry*, 276(24), 20999–21003. <https://doi.org/10.1074/jbc.M101355200>
- Whitby-Logan, G., Weech, M., & Walters, E. (2004). Zonal expression and activity of glutathione S-transferase enzymes in the mouse olfactory mucosa. *Brain Research*, 995, 151–157. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2003.09.012>
- Williams, J., & Ringsdorf, A. (2020). Human odour thresholds are tuned to atmospheric chemical lifetimes. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 375, 20190274. <https://doi.org/10.1098/rstb.2019.0274>
- Wilson, D. A., Fleming, G., Vervoordt, S. M., & Coureaud, G. (2020). Cortical processing of configurally perceived odor mixtures. *Brain Research*, 1729, 146617. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2019.146617>
- Woo, C. C., Hingco, E. E., Taylor, G. E., & Leon, M. (2006). Exposure to a broad range of odorants decreases cell mortality in the olfactory bulb. *Neuroreport*, 17(8), 817–821. <https://doi.org/10.1097/01.wnr.0000215780.84226.2d>

- Wyatt, T. D. (2017). Pheromones. *Current Biology*, 27(15), R739–R743.  
<https://doi.org/10.1016/j.cub.2017.06.039>
- Wysocki, C. J., Dorries, K. M., & Beauchamp, G. K. (1989). Ability to Perceive Androstenone Can Be Acquired by Ostensibly Anosmic People. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 86(20), 7976–7978.
- Yamakawa, R., Do, N. D., Kinjo, M., Terashima, Y., & Ando, T. (2011). Novel components of the sex pheromones produced by emerald moths: Identification, synthesis, and field evaluation. *Journal of Chemical Ecology*, 37(1), 105–113. <https://doi.org/10.1007/s10886-010-9895-y>
- Yoshikawa, K., Wang, H., Jaen, C., Haneoka, M., Saito, N., Nakamura, J., Adappa, N. D., Cohen, N. A., & Dalton, P. (2018a). The human olfactory cleft mucus proteome and its age-related changes. *Scientific Reports*, 8(1), 17170. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-35102-2>
- Yoshikawa, K., Wang, H., Jaen, C., Haneoka, M., Saito, N., Nakamura, J., Adappa, N. D., Cohen, N. A., & Dalton, P. (2018b). The human olfactory cleft mucus proteome and its age-related changes. *Scientific Reports*, 8, 17170. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-35102-2>
- Yusuf, A. A., Pirk, C. W. W., Crewe, R. M., Njagi, P. G. N., Gordon, I., & Torto, B. (2010). Nestmate Recognition and the Role of Cuticular Hydrocarbons in the African Termite Raiding Ant *Pachycondyla analis*. *Journal of Chemical Ecology*, 36(4), 441–448.  
<https://doi.org/10.1007/s10886-010-9774-6>
- Zarrow, M. X., Denenberg, V. H., & Anderson, C. O. (1965). Rabbit: Frequency of suckling in the pup. *Science (New York, N.Y.)*, 150(3705), 1835–1836.  
<https://doi.org/10.1126/science.150.3705.1835>

## Annexes

Annexe 1 : Liste des protéines retrouvés dans le mucus nasal de lapins juvéniles et leur classification selon leur fonction.

	<i>Protéines du mucus nasal de lapereaux</i>	<i>Poids (Da)</i>
<b>Structuration</b> (15.5%)	Keratin family proteins (keratin 5, 2 cytoskeletal 1 and 3, 15, 10, 2, 16, 77, 78, 17, 8, 7, etc.)	Variable
	Junction plakoglobin	81 793
	Actinin alpha 4	87 445
	IF rod domain-containing protein	61 143
	Actin, alpha skeletal muscle	42 052
	Galectin-3-binding protein	63 688
	Gelsolin	80 570
	Desmoglein 1	116 861
	Desmoplakin	224 602
	Cornulin	60 374
<b>Métabolisme générale</b> (15.3%)	Phosphopyruvate hydratase	47 274
	Pyruvate kinase	58 049
	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	35 780
	Triosephosphate isomerase	26 625
	Clusterin	59 516
	Tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein zeta	27 845
	Malate dehydrogenase	36 496
	L-lactate dehydrogenase A chain	36 565
	Transketolase	67 701
	Phosphoglycerate kinase	44 707
<b>Immunité</b> (11.1%)	Polymeric immunoglobulin receptor	83 887
	Lactotransferrin	77 484
	Jacalin-type lectin domain-containing protein	18 719
	NTR domain-containing protein	124 873
	Pregnancy zone protein	165 436



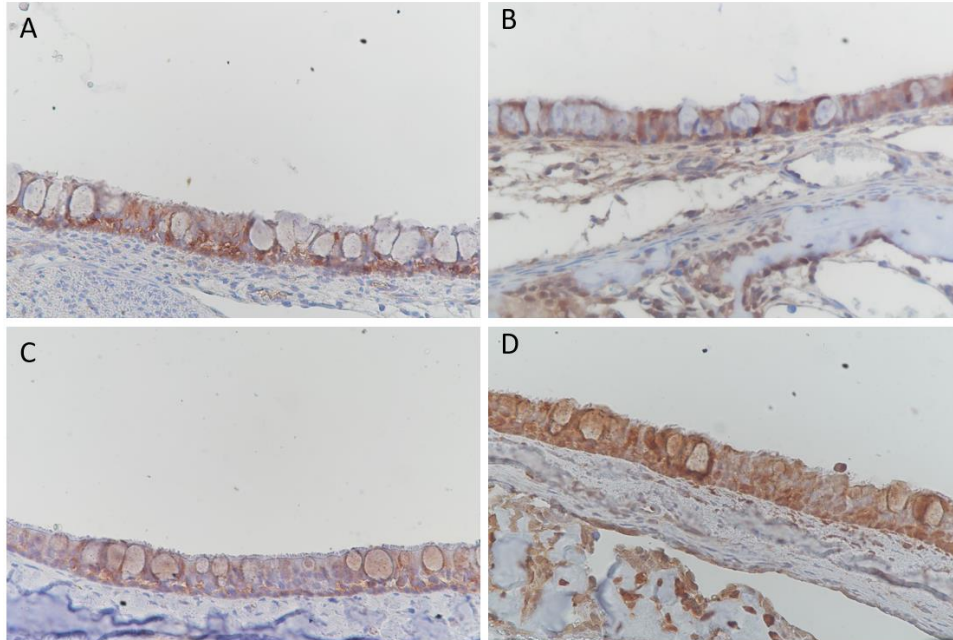
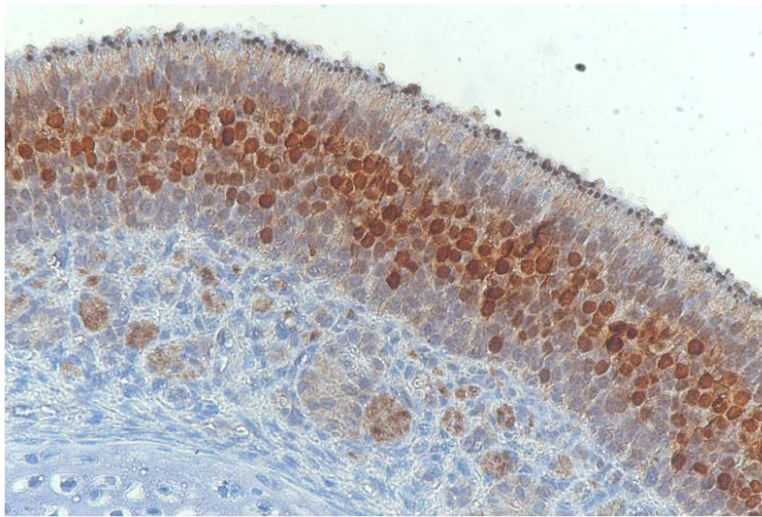
	Immunoglobulin heavy constant mu	51 970
	C3	81 845
	IgG light chain	22 879
	BPI fold containing family B member 3	43 896
	Ig gamma chain C region	35 403
<b>Protéases (8.2%)</b>	Bleomycin hydrolase	52 638
	Cathepsin D	31 736
	N-acetylated alpha-linked acidic dipeptidase 2	87 852
	Peptidase A1 domain-containing protein	44 857
	Aminopeptidase N	109 321
	Calpain-1 catalytic subunit	81 685
	Dipeptidyl peptidase 4	87 907
	Proteasome subunit beta	28 783
	Carboxypeptidase	55 598
	Kallikrein 10	22 685
<b>Signalisation (6.6%)</b>	Annexin A1	38 737
	Annexin	39 265
	Tissue transglutaminase domain-containing protein	82 093
	Staratfin	27 844
	Caspase 14	25 318
	S_100 domain-containing protein	11 123
	Calcyphosin	20 866
	Prominin 1	82 139
	EGF containing fibulin extracellular matrix protein 1	54 581
	Nucleobindin-1	53 542
<b>Enzymes métabolisant les xénobiotiques (6.2%)</b>	Aldehyde oxidase	147 696
	Glutathione S-transferase Mu3	25 499
	Aldehyde dehydrogenase 1A1	54 342
	Glutathione S-transferase Mu 1	25 419
	Flavin-containing monooxygenase	61 146
	Glutathione transferase P1	23 493
	Glutathione S-transferase Mu2	26 651

	Cytochrome P450 4B1	58 606
	Glutathione transferase Mu3	32 775
	Serum paraoxonase/lactonase 3	39 508
<b>Transport/Liaison</b> (6.2%)	Serotransferrin	76 685
	Albumin	68 692
	Alpha-fetoprotein	68 692
	Ceruloplasmin	121 191
	Haptoglobin	38 897
	Hemoglobin subunit beta-1/2	16 132
	Vitamin D-binding protein	52 924
	Fatty acid binding protein 5	12 655
	Alpha-2-HS-glycoprotein	38 385
	Transglutaminase 2	82 538
<b>Protéines de fluids</b> (5.6%)	Mucin-like glycoprotein FCGBP	273 424
	Prolactin-inducible protein homolog	17 059
	Cysteine rich secretory protein 3	27 966
	Carbonic anhydrase 6	37 399
	Fibrinogen beta chain	56 067
	Carbonic anhydrase 2	29 501
	Lipophilin CL2	10 456
	Secretoglobulin family 2B member 2	10 442
	Lipophilin AL	9 762
	Surfactant protein D	31 283
<b>Protéines membranaires</b> (5.6%)	Sodium/potassium-transporting ATPase subunit beta-1	112 998
	Retinoic acid receptor responder 1	29 142
	VWFA domain-containing protein	100 894
	VDAC1	30 742
	VDAC2	31 581
	Intelectin 1	31 009
	Anion exchange protein	102 130
	G protein-coupled receptor class C group 5 member C	52 024
	Chloride intracellular channel protein	26 965

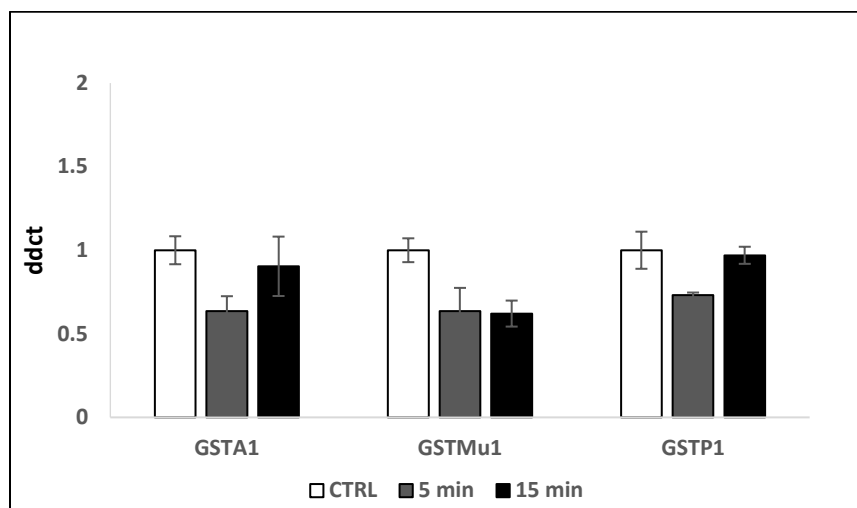
	NCCRP1, F-box associated domain containing	29 779
<i>Inhibiteurs de protéines</i> (4.7%)	Alpha-2-macroglobulin like 1	156 722
	SERPIN domain-containing protein	45 798
	Alpha-1-antiproteinase S-1	45 750
	Serpin A3	45 815
	Serpin B12	48 005
	Serpin B8	42 807
	Serpin B11	44 249
	Kininogen 1 or alpha-2-thiol proteinase inhibitor	48 659
	Serine proteinase inhibitor, clade B, member 10	45 545
	Serpin B5	48 652
<i>Chaperones</i> (3.3%)	Heat shock protein HSP 90-alpha	79 736
	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	17 934
	Heat shock protein beta-1	22 604
	Elongation factor 1-alpha	50 006
	Peptidylprolyl isomerase	40 201
	Protein disulfide-isomerase	56 809
	Peptidyl-prolyl cis-trans isomeras	20 310
	Elongation factor 1-delta	31 075
	T-complex protein 1 subunit theta	60 657
	Heat shock 70 kDa protein 13	51 851
<i>Machinerie moléculaire</i> (2.9%)	BRCA1 DNA repair associated	42 872
	NME/NM23 nucleoside diphosphate kinase	17 321
	RNA helicase	46 155
	Nucleoside diphosphate kinase	17 313
	Deoxyribonuclease-1	31 346
	Purine nucleoside phosphorylase	32 135
	Guanine deaminase	51 129
	5'-nucleotidase	63 220
	3'(2), 5'-bisphosphate nucleotidase 1	33 389
	Poly(rC)-binding protein 1	37 498
<i>Oxyd</i>	Amine oxidase	58 927

	Sulfhydryl oxidase	77 694
	Biliverdin reductase B	22 458
	NADPH-cytochrome P450 reductase	76 589
	Prostaglandin-E(2) 9-reductase	36 672
	Polyunsaturated fatty acid lipoxygenase ALOX15	75 312
	Carbonyl reductase (NADPH)	30 263
	Short chain dehydrogenase/reductase family 9C member 7	35 325
	Peptidylglycine alpha-amidating monooxygenase	108 364
<i>Protéines liant les odorants (1.4%)</i>	Lipocln_cytosolic_FA-bd_dom domain-containing protein	19 283
	Lipocln_cytosolic_FA-bd_dom domain-containing protein	19 674
	Lipocalin 2	22 942
	Lipocln_cytosolic_FA-bd_dom domain-containing protein	17 976
	Lipocln_cytosolic_FA-bd_dom domain-containing protein	20 925
	Odorant-binding protein 3	4 721
	Odorant-binding protein 2	1 831
<i>Antioxydants (1.4%)</i>	Glutathione peroxidase	25 338
	Gamma-glutamylcyclotransferase	20 874
	Peroxiredoxin-6	25 250
	Catalase	59 658
	Peroxiredoxin-1	22 153
	Glutathione synthetase	52 208
	Superoxide dismutase [Cu-Zn]	15 611
<i>Elimination (0.8%)</i>	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase	26 195
	Ubiquitin-like modifier-activating enzyme 1	117 689
	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 13	42 769
	26S proteasome regulatory subunit 7	52 376

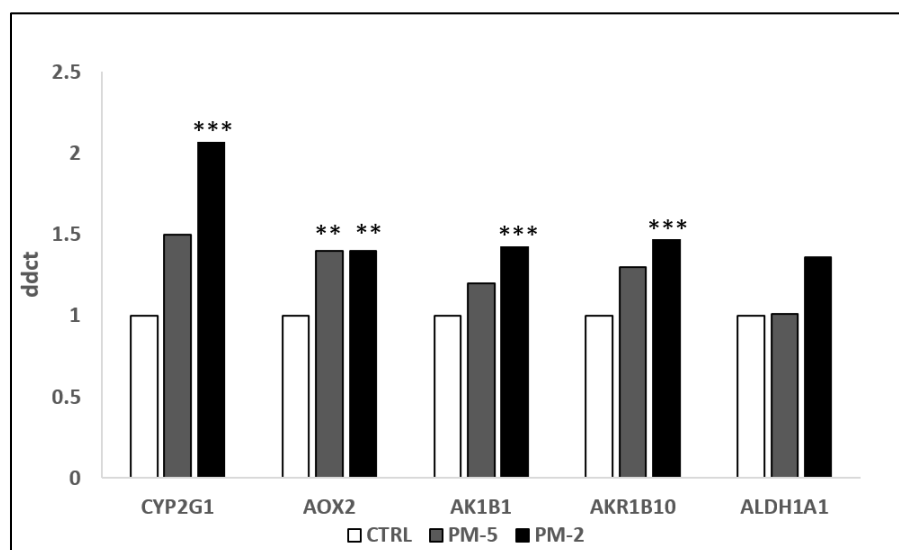
Annexe 2 : Immunohistochimie en visible (x40) de l'OMP (olfactory marker protein) dans l'épithélium olfactif de lapin nouveau-né.



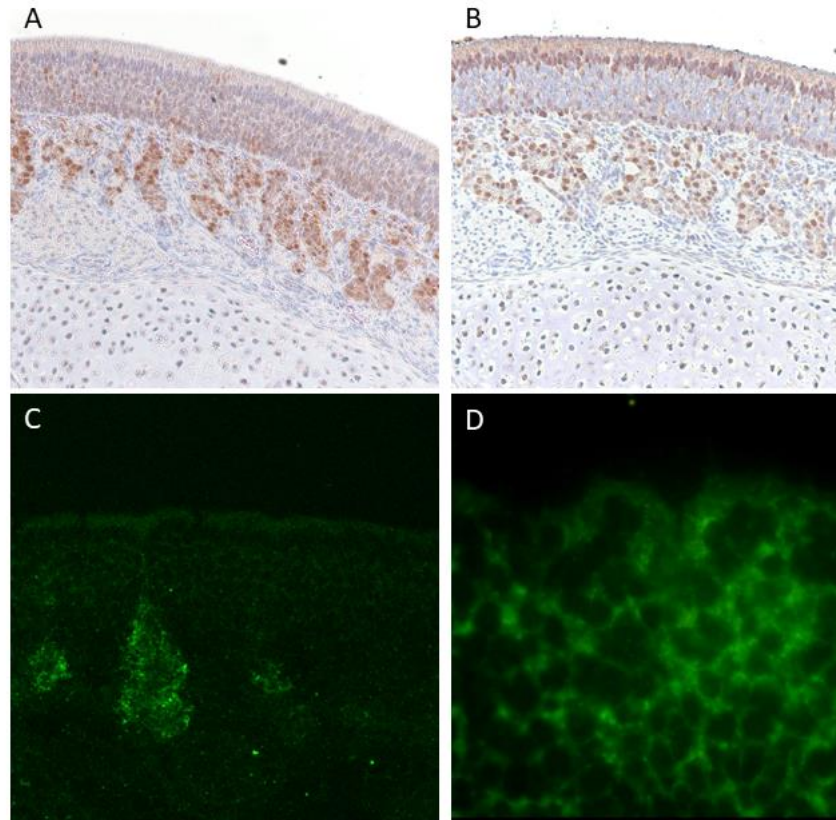
Annexe 3 : Immunohistochimie en visible (x40) de GSTA (A, C) et de GSTP1 (B, D) dans l'épithélium respiratoire de lapins nouveau-nés (A, B) et sevrés (C, D).



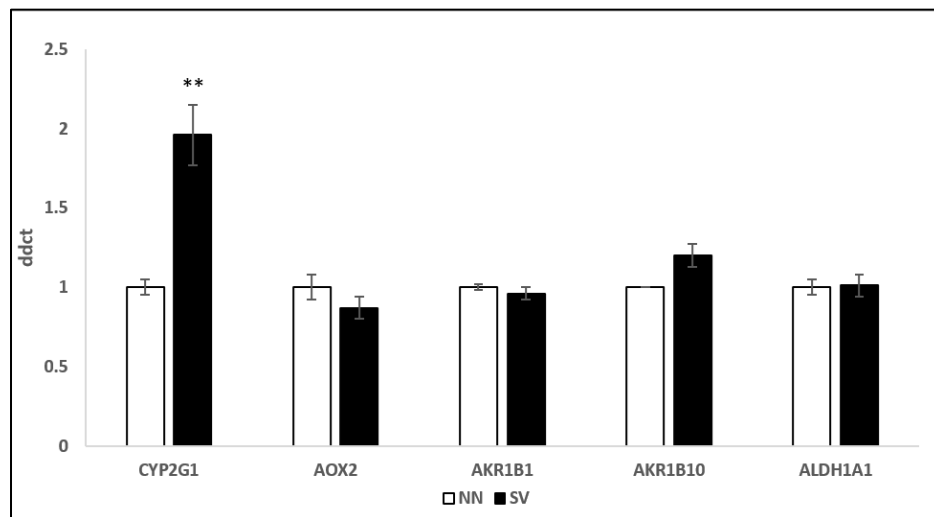
Annexe 4 : Expression des ARNm des GSTs dans la muqueuse olfactive de lapins nouveau-nés (n=5) après exposition à la PM à  $10^{-5}$  g/ml pendant 5 et 15 min comparé à des lapins non exposés (CTRL).



Annexe 5 : Expression des ARNm des EMXs dans la muqueuse olfactive de lapins nouveau-nés (n=5) après exposition à la PM à  $10^{-5}$  g/ml (PM<sup>-5</sup>) et  $10^{-2}$  g/ml (PM<sup>-2</sup>) comparé à des lapins exposés à l'eau (CTRL).



Annexe 6 : Immunohistochimie x20 (A,B) et hybridation *in situ* x 20 (C, D) de GSTA1 (A, C) et GSTP1 (C,D) dans l'épithélium olfactif de lapins nouveau-nés exposés à la PM à  $10^{-5}$  g/ml.



Annexe 7 : Expression des ARNm des EMXs dans la muqueuse olfactive de lapins sevrés (SV) par rapport à des lapins nouveau-nés (NN).

Annexe 8 : P-value des différents tests statistiques utilisés dans l'étude II du manuscrit.

CS 10 <sup>-5</sup> g/ml	<i>Serie 1: A<sup>-5</sup>, A<sup>-10</sup>, A<sup>-15</sup>, A<sup>-19</sup>, A<sup>-20</sup> (p-value &lt; 0.0001)</i>										
	<i>Serie 2: A<sup>-5</sup>, A<sup>-16</sup>, A<sup>-17</sup>, A<sup>-18</sup>, A<sup>-21</sup>, A<sup>-22</sup> (p-value: 0.0001)</i>										
	A <sup>-5</sup>	A <sup>-10</sup>	A <sup>-15</sup>	A <sup>-16</sup>	A <sup>-17</sup>	A <sup>-18</sup>	A <sup>-19</sup>	A <sup>-20</sup>	A <sup>-21</sup>	A <sup>-22</sup>	MP
A <sup>-5</sup>	ns	ns	ns	ns	ns	ns	0.013/< 0.001	0,023/0.002	0.041/0,007	0.041/0,007	ns
A <sup>-10</sup>			ns	ns	ns	ns	0.008	0.013	0.002	0.002	ns
A <sup>-15</sup>				ns	ns	ns	0.013	0.023	0.007	0.007	ns
A <sup>-16</sup>					ns	ns	<0.001	0.002	0.041	0.041	ns
A <sup>-17</sup>						ns	0.001	0.006	(0.074)	(0.074)	ns
A <sup>-18</sup>							0.003	0.019	ns	ns	ns
A <sup>-19</sup>								ns	ns	ns	0.004/<0.001
A <sup>-20</sup>									ns	ns	0.008/<0.001
A <sup>-21</sup>										ns	0.013/<0.001
A <sup>-22</sup>											0.013/<0.001

CS 10 <sup>-10</sup> g/ml	<i>Serie 1: A<sup>-5</sup>, A<sup>-10</sup>, A<sup>-15</sup>, A<sup>-19</sup>, A<sup>-20</sup> (p-value: 0.002)</i>										
	<i>Serie 2: A<sup>-10</sup>, A<sup>-16</sup>, A<sup>-17</sup>, A<sup>-18</sup>, A<sup>-21</sup>, A<sup>-22</sup> (p-value: 0.043)</i>										
	A <sup>-5</sup>	A <sup>-10</sup>	A <sup>-15</sup>	A <sup>-16</sup>	A <sup>-17</sup>	A <sup>-18</sup>	A <sup>-19</sup>	A <sup>-20</sup>	A <sup>-21</sup>	A <sup>-22</sup>	MP
A <sup>-5</sup>	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
A <sup>-10</sup>			ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	0.005	ns
A <sup>-15</sup>				ns	ns	ns	ns	ns	ns	0.005	ns
A <sup>-16</sup>					ns	ns	ns	ns	ns	0.041	ns
A <sup>-17</sup>						ns	ns	ns	ns	ns	ns
A <sup>-18</sup>							ns	ns	ns	(0.074)	ns
A <sup>-19</sup>								ns	ns	0.005	ns
A <sup>-20</sup>									ns	ns	ns
A <sup>-21</sup>										ns	ns
A <sup>-22</sup>											0.041/<0.001



CS 10 <sup>-15</sup> g/ml	<i>Serie 1: A<sup>-5</sup>, A<sup>-10</sup>, A<sup>-15</sup>, A<sup>-19</sup>, A<sup>-20</sup> (p-value &lt; 0.0001)</i>										
	<i>Serie 2: A<sup>-15</sup>, A<sup>-16</sup>, A<sup>-17</sup>, A<sup>-18</sup>, A<sup>-21</sup>, A<sup>-22</sup> (p-value &lt; 0.0001)</i>										
	A <sup>-5</sup>	A <sup>-10</sup>	A <sup>-15</sup>	A <sup>-16</sup>	A <sup>-17</sup>	A <sup>-18</sup>	A <sup>-19</sup>	A <sup>-20</sup>	A <sup>-21</sup>	A <sup>-22</sup>	MP
A <sup>-5</sup>	ns	ns	0.008/<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	ns	ns	ns	ns	0.004
A <sup>-10</sup>			0.008/<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	ns	ns	ns	ns	0.004
A <sup>-15</sup>				ns	ns	ns	0.041/0.001	0.013/<0.001	0.008/<0.001	0.004/<0.001	ns
A <sup>-16</sup>					ns	ns	0.025	0.002	0.023	0.013	ns
A <sup>-17</sup>						ns	0.001	<0.001	0.008	0.004	ns
A <sup>-18</sup>							0.025	0.002	0.023	0.013	ns
A <sup>-19</sup>								ns	ns	ns	0.023/0.001
A <sup>-20</sup>									ns	ns	0.008/<0.001
A <sup>-21</sup>										ns	0.008/<0.001
A <sup>-22</sup>											0.004/<0.001

CS 10 <sup>-17</sup> g/ml	<i>Serie 1: A<sup>-16</sup>, A<sup>-17</sup>, A<sup>-18</sup>, A<sup>-21</sup>, A<sup>-22</sup> (p-value: 0.026)</i>										
	<i>Serie 2: A<sup>-10</sup>, A<sup>-15</sup>, A<sup>-17</sup>, A<sup>-19</sup>, A<sup>-20</sup>, A<sup>-23</sup> (p-value &lt; 0.0001)</i>										
	A <sup>-10</sup>	A <sup>-15</sup>	A <sup>-16</sup>	A <sup>-17</sup>	A <sup>-18</sup>	A <sup>-19</sup>	A <sup>-20</sup>	A <sup>-21</sup>	A <sup>-22</sup>	A <sup>-23</sup>	MP
A <sup>-10</sup>	ns	ns	0.002	0.004/<0.001	<0.001	0.013	ns	<0.001	ns	ns	0.004/<0.001
A <sup>-15</sup>			0.002	0.004/<0.001	<0.001	0.013	ns	<0.001	ns	ns	0.004/<0.001
A <sup>-16</sup>				ns	ns	ns	ns	ns	ns	0.002	ns
A <sup>-17</sup>					ns	ns	0.041/0.027	ns	(0.074)/0.002	0.004/<0.001	ns
A <sup>-18</sup>						ns	0.027	ns	(0.074)	<0.001	ns
A <sup>-19</sup>							ns	ns	0.04	0.013	ns
A <sup>-20</sup>								0.027	ns	ns	0.041/0.005
A <sup>-21</sup>									ns	<0.001	ns
A <sup>-22</sup>										ns	0.041/0.002
A <sup>-23</sup>											0.004/<0.001

CS 10 <sup>-19</sup> g/ml	<i>Serie 1: A<sup>-16</sup>, A<sup>-17</sup>, A<sup>-18</sup>, A<sup>-19</sup>, A<sup>-21</sup>, A<sup>-22</sup> (p-value &lt; 0.0001)</i>										
	<i>Serie 2: A<sup>-15</sup>, A<sup>-19</sup>, A<sup>-20</sup>, A<sup>-23</sup>, A<sup>-24</sup> (p-value &lt; 0.0001)</i>										
	A <sup>-15</sup>	A <sup>-16</sup>	A <sup>-17</sup>	A <sup>-18</sup>	A <sup>-19</sup>	A <sup>-20</sup>	A <sup>-21</sup>	A <sup>-22</sup>	A <sup>-23</sup>	A <sup>-24</sup>	MP
A <sup>-15</sup>	ns	ns	<b>0.02</b>	<b>&lt;0.001</b>	0.013/ <b>&lt;0.001</b>	0.013	ns	ns	ns	ns	0.004/ <b>&lt;0.001</b>
A <sup>-16</sup>			ns	0.004	0.013/ <b>0.001</b>	<b>0.001</b>	0.013	(0.074)	ns	ns	0.003/ <b>&lt;0.001</b>
A <sup>-17</sup>				(0.077)	ns	ns	ns	ns	<b>0.02</b>	<b>0.02</b>	0.023
A <sup>-18</sup>					ns	ns	ns	ns	<b>&lt;0.001</b>	<b>&lt;0.001</b>	ns
A <sup>-19</sup>						ns	ns	ns	0.013/ <b>&lt;0.001</b>	0.013/ <b>&lt;0.001</b>	ns
A <sup>-20</sup>							ns	ns	0.013	0.013	ns
A <sup>-21</sup>								ns	ns	ns	ns
A <sup>-22</sup>								ns	ns	ns	0.041
A <sup>-23</sup>										ns	0.004/ <b>&lt;0.001</b>
A <sup>-24</sup>											0.004/ <b>&lt;0.001</b>

CS 10 <sup>-20</sup> g/ml	<i>Serie 1: A<sup>-16</sup>, A<sup>-17</sup>, A<sup>-18</sup>, A<sup>-20</sup>, A<sup>-21</sup>, A<sup>-22</sup> (p-value &lt; 0.0001)</i>										
	<i>Serie 2: A<sup>-19</sup>, A<sup>-20</sup>, A<sup>-23</sup>, A<sup>-24</sup>, A<sup>-25</sup> (p-value &lt; 0.0001)</i>										
	A <sup>-16</sup>	A <sup>-17</sup>	A <sup>-18</sup>	A <sup>-19</sup>	A <sup>-20</sup>	A <sup>-21</sup>	A <sup>-22</sup>	A <sup>-23</sup>	A <sup>-24</sup>	A <sup>-25</sup>	MP
A <sup>-16</sup>	ns	ns	ns	<b>0.001</b>	0.023/ <b>&lt;0.001</b>	0.008	0.023	<b>0.004</b>	<b>0.013</b>	ns	0.004/ <b>&lt;0.001</b>
A <sup>-17</sup>			ns	<b>0.001</b>	0.023/ <b>&lt;0.001</b>	0.008	0.023	<b>0.004</b>	<b>0.013</b>	ns	0.004/ <b>&lt;0.001</b>
A <sup>-18</sup>				<b>0.005</b>	(0.077)/ <b>0.001</b>	0.013	0.041	<b>0.017</b>	<b>0.049</b>	ns	0.008/ <b>&lt;0.001</b>
A <sup>-19</sup>					ns	ns	ns	ns	ns	0.013	ns
A <sup>-20</sup>						ns	ns	ns	ns	0.008/ <b>0.001</b>	ns
A <sup>-21</sup>							ns	ns	ns	<b>&lt;0.001</b>	ns
A <sup>-22</sup>								ns	ns	<b>&lt;0.001</b>	ns
A <sup>-23</sup>								ns	0.023	ns	ns
A <sup>-24</sup>									0.041	ns	ns
A <sup>-25</sup>											0.004/ <b>&lt;0.001</b>

CS 10 <sup>-21</sup> g/ml	<i>Serie 1: A<sup>-16</sup>, A<sup>-17</sup>, A<sup>-18</sup>, A<sup>-21</sup>, A<sup>-22</sup> (p-value &lt; 0.0001)</i>										
	<i>Serie 2: A<sup>-19</sup>, A<sup>-20</sup>, A<sup>-21</sup>, A<sup>-23</sup>, A<sup>-24</sup>, A<sup>-25</sup> (p-value &lt; 0.0001)</i>										
	A <sup>-16</sup>	A <sup>-17</sup>	A <sup>-18</sup>	A <sup>-19</sup>	A <sup>-20</sup>	A <sup>-21</sup>	A <sup>-22</sup>	A <sup>-23</sup>	A <sup>-24</sup>	A <sup>-25</sup>	MP
A <sup>-16</sup>	ns	ns	ns	ns	<0.001	0.004/<0.001	0.008	0.01	ns	ns	0.004/<0.001
A <sup>-17</sup>			ns	ns	<0.001	0.004/<0.001	0.008	0.01	ns	ns	0.004/<0.001
A <sup>-18</sup>				ns	0.002	0.013/<0.001	0.023	ns	ns	ns	0.013/<0.001
A <sup>-19</sup>					(0.077)	0.023/0.001	0.006	ns	ns	ns	0.023/0.001
A <sup>-20</sup>						ns	ns	ns	0.008	0.008	ns
A <sup>-21</sup>							ns	(0.074)/0.01	0.004/<0.001	0.004/<0.001	ns
A <sup>-22</sup>								ns	<0.001	<0.001	ns
A <sup>-23</sup>									(0.074)	(0.074)	0.01
A <sup>-24</sup>										ns	0.004/<0.001
A <sup>-25</sup>											0.004/<0.001

CS 10 <sup>-22</sup> g/ml	<i>Serie 1: A<sup>-19</sup>, A<sup>-21</sup>, A<sup>-22</sup>, A<sup>-23</sup>, A<sup>-24</sup> (p-value: 0.001)</i>									
	<i>Serie 2: A<sup>-18</sup>, A<sup>-20</sup>, A<sup>-22</sup>, A<sup>-23</sup>, A<sup>-25</sup> (p-value &lt; 0.0001)</i>									
	A <sup>-18</sup>	A <sup>-19</sup>	A <sup>-20</sup>	A <sup>-21</sup>	A <sup>-22</sup>	A <sup>-23</sup>	A <sup>-24</sup>	A <sup>-25</sup>	MP	
A <sup>-18</sup>	ns	ns	ns	0.031	0.023/<0.001	0.041/0.011	ns	ns	0.008/<0.001	
A <sup>-19</sup>			ns	ns	0.013/0.005	(0.074)/0.017	ns	ns	0.013/<0.001	
A <sup>-20</sup>				ns	(0.074)/0.004	ns	ns	ns	0.023	
A <sup>-21</sup>					ns	ns	ns	0.006	ns	
A <sup>-22</sup>						ns	0.041	0.013/<0.001	ns	
A <sup>-23</sup>							ns	0.023/0.002	ns	
A <sup>-24</sup>								ns	0.041	
A <sup>-25</sup>									0.004/<0.001	

CS 10 <sup>-5</sup> g/ml	<i>Serie 1: B<sup>-5</sup>, B<sup>-10</sup>, B<sup>-19</sup>, B<sup>-20</sup> (p-value: 0.0002)</i>									
	<i>Serie 2: B<sup>-5</sup>, B<sup>-15</sup>, B<sup>-16</sup>, B<sup>-17</sup>, B<sup>-18</sup>, B<sup>-21</sup> (p-value &lt; 0.0001)</i>									
	B <sup>-5</sup>	B <sup>-10</sup>	B <sup>-15</sup>	B <sup>-16</sup>	B <sup>-17</sup>	B <sup>-18</sup>	B <sup>-19</sup>	B <sup>-20</sup>	B <sup>-21</sup>	MP
B <sup>-5</sup>	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	0.023/0.003	0.008/< 0.001	ns
B <sup>-10</sup>			ns	ns	ns	ns	ns	0.023	< 0.001	ns
B <sup>-15</sup>				ns	ns	ns	ns	0.003	0.008	ns
B <sup>-16</sup>					ns	ns	ns	0.003	0.008	ns
B <sup>-17</sup>						ns	ns	0.012	0.013	ns
B <sup>-18</sup>							ns	0.023/0.003	0.008	ns
B <sup>-19</sup>								ns	< 0.001	0.023
B <sup>-20</sup>									ns	< 0.001
B <sup>-21</sup>										0.004/< 0.001

CS 10 <sup>-10</sup> g/ml	<i>Serie 1: B<sup>-5</sup>, B<sup>-10</sup>, B<sup>-15</sup>, B<sup>-19</sup>, B<sup>-20</sup> (p-value &lt; 0.0001)</i>										
	<i>Serie 2: B<sup>-10</sup>, B<sup>-16</sup>, B<sup>-17</sup>, B<sup>-18</sup>, B<sup>-21</sup>, B<sup>-22</sup> (p-value &lt; 0.0001)</i>										
	B <sup>-5</sup>	B <sup>-10</sup>	B <sup>-15</sup>	B <sup>-16</sup>	B <sup>-17</sup>	B <sup>-18</sup>	B <sup>-19</sup>	B <sup>-20</sup>	B <sup>-21</sup>	B <sup>-22</sup>	MP
B <sup>-5</sup>	ns	ns	ns	0.003	< 0.001	< 0.001	0.023	0.013	< 0.001	< 0.001	ns
B <sup>-10</sup>			ns	0.041/0.003	0.013/< 0.001	0.013/< 0.001	0.023/0.003	0.013/< 0.001	0.013/< 0.001	0.013/< 0.001	ns
B <sup>-15</sup>				0.003	< 0.001	< 0.001	0.023	0.013	< 0.001	< 0.001	ns
B <sup>-16</sup>					ns	ns	ns	ns	ns	ns	0.041/< 0.001
B <sup>-17</sup>						ns	ns	ns	ns	ns	0.013/< 0.001
B <sup>-18</sup>							ns	ns	ns	ns	0.013/< 0.001
B <sup>-19</sup>								ns	ns	ns	0.013/0.003
B <sup>-20</sup>									ns	ns	0.008/< 0.001
B <sup>-21</sup>										ns	0.013/< 0.001
B <sup>-22</sup>											0.013/< 0.001

CS 10 <sup>-15</sup> g/ml	<i>Serie 1: B<sup>-5</sup>, B<sup>-10</sup>, B<sup>-15</sup>, B<sup>-20</sup> (p-value: 0.0002)</i>								
	<i>Serie 2: B<sup>-15</sup>, B<sup>-16</sup>, B<sup>-17</sup>, B<sup>-18</sup>, B<sup>-19</sup> (p-value &lt; 0.0001)</i>								
	B <sup>-5</sup>	B <sup>-10</sup>	B <sup>-15</sup>	B <sup>-16</sup>	B <sup>-17</sup>	B <sup>-18</sup>	B <sup>-19</sup>	B <sup>-20</sup>	MP
B <sup>-5</sup>	ns	ns	ns	ns	<b>0.037</b>	<b>0.003</b>	< <b>0.001</b>	0,023	ns
B <sup>-10</sup>			ns	ns	<b>0.009</b>	<b>0.001</b>	< <b>0.001</b>	0,013	ns
B <sup>-15</sup>				ns	(0.074)/ <b>0.037</b>	0.023/ <b>0.003</b>	0.013/< <b>0.001</b>	0.023/< <b>0.001</b>	ns
B <sup>-16</sup>					ns	0.041	0.023	<b>0.002</b>	ns
B <sup>-17</sup>						ns	ns	ns	0.023/ <b>0.002</b>
B <sup>-18</sup>							ns	ns	0.008/< <b>0.001</b>
B <sup>-19</sup>								ns	0.004/< <b>0.001</b>
B <sup>-20</sup>									0.008/< <b>0.001</b>

CS 10 <sup>-17</sup> g/ml	<i>Serie 1: B<sup>-10</sup>, B<sup>-15</sup>, B<sup>-17</sup>, B<sup>-19</sup>, B<sup>-20</sup> (p-value: 0.118)</i>										
	<i>Serie 2: B<sup>-5</sup>, B<sup>-16</sup>, B<sup>-17</sup>, B<sup>-18</sup>, B<sup>-21</sup>, B<sup>-22</sup>(p-value: 0.001)</i>										
	B <sup>-5</sup>	B <sup>-10</sup>	B <sup>-15</sup>	B <sup>-16</sup>	B <sup>-17</sup>	B <sup>-18</sup>	B <sup>-19</sup>	B <sup>-20</sup>	B <sup>-21</sup>	B <sup>-22</sup>	MP
B <sup>-5</sup>	ns	ns	ns	ns	0.041/ <b>0.006</b>	0.041	ns	ns	0.074	ns	0.008
B <sup>-10</sup>			ns	ns	(0.074)/ <b>0.025</b>	<b>0.025</b>	ns	ns	ns	ns	0.023/< <b>0.001</b>
B <sup>-15</sup>				ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	<b>0.01</b>
B <sup>-16</sup>					ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
B <sup>-17</sup>						ns	ns	ns	ns	(0.074)/ <b>0.025</b>	ns
B <sup>-18</sup>							ns	ns	ns	(0.074)	ns
B <sup>-19</sup>								ns	ns	ns	<b>0.01</b>
B <sup>-20</sup>								ns	ns	ns	<b>0.003</b>
B <sup>-21</sup>									ns	ns	ns
B <sup>-22</sup>											0.013/ <b>0.002</b>

CS 10 <sup>-19</sup> g/ml	<i>Serie 1: B<sup>-5</sup>, B<sup>-10</sup>, B<sup>-15</sup>, B<sup>-17</sup>, B<sup>-19</sup>, B<sup>-21</sup> (p-value &lt; 0.0001)</i>										
	<i>Serie 2: B<sup>-16</sup>, B<sup>-18</sup>, B<sup>-19</sup>, B<sup>-20</sup>, B<sup>-22</sup> (p-value: 0.002)</i>										
	B <sup>-5</sup>	B <sup>-10</sup>	B <sup>-15</sup>	B <sup>-16</sup>	B <sup>-17</sup>	B <sup>-18</sup>	B <sup>-19</sup>	B <sup>-20</sup>	B <sup>-21</sup>	B <sup>-22</sup>	MP
B <sup>-5</sup>	ns	ns	ns	ns	ns	ns	0.023/0.001	ns	ns	ns	0.004/< 0.001
B <sup>-10</sup>			ns	ns	ns	ns	0.023/0.001	ns	ns	ns	0.004/< 0.001
B <sup>-15</sup>				ns	ns	ns	0.041/0.006	ns	ns	ns	0.008/< 0.001
B <sup>-16</sup>					0.001	ns	0.023	ns	ns	ns	0.004/< 0.001
B <sup>-17</sup>						ns	0.025	ns	ns	ns	0.013/< 0.001
B <sup>-18</sup>							ns	ns	ns	ns	0.041/0.003
B <sup>-19</sup>								ns	ns	(0.074)/0.025	ns
B <sup>-20</sup>									ns	ns	0.041/0.003
B <sup>-21</sup>										ns	0.041/0.003
B <sup>-22</sup>											0.013/< 0.001

CS 10 <sup>-20</sup> g/ml	<i>Serie 1: B<sup>-5</sup>, B<sup>-10</sup>, B<sup>-15</sup>, B<sup>-17</sup>, B<sup>-19</sup>, B<sup>-20</sup> (p-value: 0.001)</i>										
	<i>Serie 2: B<sup>-16</sup>, B<sup>-18</sup>, B<sup>-20</sup>, B<sup>-21</sup>, B<sup>-22</sup> (p-value: 0.154)</i>										
	B <sup>-5</sup>	B <sup>-10</sup>	B <sup>-15</sup>	B <sup>-16</sup>	B <sup>-17</sup>	B <sup>-18</sup>	B <sup>-19</sup>	B <sup>-20</sup>	B <sup>-21</sup>	B <sup>-22</sup>	MP
B <sup>-5</sup>	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	0.023	ns	ns	0.008/< 0.001
B <sup>-10</sup>			ns	ns	ns	ns	ns	0.023	ns	ns	0.008/< 0.001
B <sup>-15</sup>				ns	ns	ns	ns	0.041	ns	ns	0.013/< 0.001
B <sup>-16</sup>					ns	ns	ns	0.002	ns	ns	0.008/< 0.001
B <sup>-17</sup>						ns	ns	ns	ns	ns	0.041/0.003
B <sup>-18</sup>							ns	0.025	ns	ns	0.023/0.001
B <sup>-19</sup>								ns	ns	ns	0.01
B <sup>-20</sup>									0.025	0.002	0.01
B <sup>-21</sup>										ns	0.023/0.001
B <sup>-22</sup>											0.008/< 0.001

CS 10 <sup>-21</sup> g/ml	<i>Serie 1: B<sup>-5</sup>, B<sup>-10</sup>, B<sup>-15</sup>, B<sup>-19</sup>, B<sup>-20</sup>, B<sup>-21</sup> (p-value &lt; 0.0001)</i>										
	<i>Serie 2: B<sup>-16</sup>, B<sup>-17</sup>, B<sup>-18</sup>, B<sup>-21</sup>, B<sup>-22</sup> (p-value &lt; 0.0001)</i>										
	B <sup>-5</sup>	B <sup>-10</sup>	B <sup>-15</sup>	B <sup>-16</sup>	B <sup>-17</sup>	B <sup>-18</sup>	B <sup>-19</sup>	B <sup>-20</sup>	B <sup>-21</sup>	B <sup>-22</sup>	MP
B <sup>-5</sup>	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	0.023	0.013/< 0.001	ns	0.003/< 0.001
B <sup>-10</sup>			ns	ns	ns	ns	ns	0.023	0.013/< 0.001	ns	0.003/< 0.001
B <sup>-15</sup>				ns	ns	ns	ns	0.023	0.013/< 0.001	ns	0.003/< 0.001
B <sup>-16</sup>					ns	ns	ns	<b>0.002</b>	0.013/0.001	ns	0.004/< 0.001
B <sup>-17</sup>						ns	ns	<b>0.044</b>	0.041/0.016	ns	0.013/< 0.001
B <sup>-18</sup>							ns	<b>0.044</b>	0.041/0.016	ns	0.013/< 0.001
B <sup>-19</sup>								(0.074)	0.041/0.005	ns	0.008/< 0.001
B <sup>-20</sup>									ns	<b>0.002</b>	ns
B <sup>-21</sup>										0.013/0.001	ns
B <sup>-22</sup>											0.004/< 0.001