



HAL
open science

Effet de l'odorisation périnatale sur la plasticité du système olfactif chez le souriceau

Vincent Lalère, Marie-Annick Persuy, Christine Baly

► To cite this version:

Vincent Lalère, Marie-Annick Persuy, Christine Baly. Effet de l'odorisation périnatale sur la plasticité du système olfactif chez le souriceau. [0] 2016, 23 p. <hal-02794989>

HAL Id: hal-02794989

<https://hal.inrae.fr/hal-02794989v1>

Submitted on 5 Jun 2020

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

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



HAL Authorization



Master 1 : Biologie santé : Physiologie et physiopathologie

Effet de l'odorisation périnatale sur la plasticité du système olfactif chez le souriceau

Soutenu le : 20-21/06/2016 par Vincent Lalère

Tutrices : Marie Annick Persuy et Christine Baly

Date du stage : 18 Avril 2016 – 16 Juin 2016

**Centre de Recherche Inra de Jouy-en-Josas, Domaine de Vilvert, 4 avenue Jean
Jaurès, 78352 Jouy-en-Josas Cedex
Unité de Neurobiologie de l'Olfaction (NBO) - UR 1197**

Remerciements

Je tiens à remercier dans un premier dans premier temps Nicolas Meunier de m'avoir aiguillé et conseillé auprès de ses collègues de l'unité NBO et par conséquent de m'avoir permis d'effectuer mon stage au sein du laboratoire dans lequel il officie. Je tiens aussi à remercier aussi Edith Pajot, responsable de l'unité NBO, d'avoir accepté de m'accueillir dans son unité.

Je remercie tous les membres de l'unité NBO pour leur accueil chaleureux et leur bonne humeur tout au long de ces deux mois de stages ainsi que tous ceux qui m'ont aidé de près ou de loin d'un point de vue théorique, expérimental, pratique ou technique. Mes remerciements vont plus particulièrement à Marie-Annick Persuy, ma tutrice, avec qui j'ai fait la plupart des expérimentations durant mon stage, qui m'a suivi et conseillé sur le plan rédactionnel et résultats ainsi que sur un plan plus personnel vis-à-vis du parcours post-Master 1.

Je remercie aussi Christine Baly, co-tutrice lors de mon stage, pour son encadrement et ses conseils avisés vis-à-vis de l'écriture de ce rapport d'un point de vue bibliographique, technique, traitement des résultats et rédaction ainsi que du temps qu'elle m'a consacré tout au long de mon stage en dépit d'un emploi du temps chargé.

Je remercie Marie-Christine Lacroix et Karine Badonnel de m'avoir aidé à faire les analyses statistiques de mes données expérimentales. Enfin, je tiens à remercier Aurélie Dewaele pour sa disponibilité, sa sympathie et sa pédagogie lors des différentes expérimentations que j'ai pu effectuer en sa compagnie.

Présentation de la structure

Premier institut de recherche agronomique en Europe avec 8 417 chercheurs, ingénieurs et techniciens, au 2^e rang mondial pour ses publications en sciences agronomiques, l'Inra contribue à la production de connaissances et à l'innovation dans l'alimentation, l'agriculture et l'environnement. L'Institut déploie sa stratégie de recherche en mobilisant ses 13 départements scientifiques et en s'appuyant sur un réseau national unique en Europe, fort de plus de 200 unités de recherche et unités expérimentales. L'ambition est, dans une perspective mondiale, de contribuer à assurer une alimentation saine et de qualité, une agriculture compétitive et durable ainsi qu'un environnement préservé et valorisé. L'INRA, dirigé par François Houllier, est organisé en 17 centres de recherches qui sont implantés dans tout le territoire, y compris en Outre-mer. La collaboration avec de nombreux partenaires, qu'ils soient privés ou publics, a permis l'établissement de 7 conventions de partenariats avec les Régions, d'Accords-cadres avec les universités (6 signatures en 2014), de contrats de plan État-Région (CPER) ainsi que de nombreux pilotes préindustriels et programmes public-privé. Les financements de l'institut proviennent à 77 % du ministère chargé de la Recherche, et à 20 % de crédits publics.

Créé en 1946, le centre de Jouy-en-Josas a pour mission de produire des connaissances scientifiques et de contribuer à l'innovation dans les domaines de la biologie animale, la microbiologie et les sciences de l'aliment. Les recherches mobilisent également des unités de mathématiciens et informaticiens pour appréhender la complexité des mécanismes biologiques étudiés et prédire le fonctionnement de systèmes vivants à différentes échelles et pour des finalités variées. Les 32 unités de recherches du centre se mobilisent pour allier connaissances fondamentales et appliquées, explorant la diversité et la variabilité, de la molécule à l'individu dans son environnement.

L'unité de Neurobiologie de l'Olfaction (NBO) dans laquelle j'ai travaillé durant ce stage se compose d'une trentaine de personnes et résulte de la création en 2003 d'une unité dédiée à l'étude de l'olfaction chez les rongeurs et de la fusion, en 2014, de l'unité Neurobiologie de l'Olfaction et Modélisation en Imagerie (NOeMI) et d'une partie de l'unité Nutrition et Régulation Lipidique des Fonctions Cérébrales (NuRéLiCe). NBO est notamment membre fondateur de SAPS (Sciences Animales Paris-Saclay) : un collectif de recherche multidisciplinaire et structurant d'envergure internationale dédié à la biologie animale, au service de l'élevage et de la santé regroupant 5 unités du centre de Jouy. Elle

est rattachée au département PHASE (Physiologie Animale et Système d'Élevage) qui a pour mission de concevoir des systèmes d'élevage durables, tant sur le plan socio-économique qu'environnemental. NBO étudie les bases neurobiologiques de la perception des odeurs chez les mammifères et les modulations s'opérant en réponse à des variations de l'environnement interne ou externe de l'animal. Pour cela, les études menées englobent deux composantes qui sont les mécanismes moléculaires et cellulaires régissant la réception du signal odorant et son traitement ainsi que sa résultante comportementale sur différents modèles de rongeurs. Les travaux menés tendent donc à explorer les mécanismes de la détection d'odorants par les récepteurs olfactifs au niveau de la muqueuse olfactive et ainsi à identifier les acteurs moléculaires impliqués dans la transduction de l'information olfactive. L'étude de la discrimination des odeurs proches ainsi que l'attribution d'une valeur positive ou négative aux odeurs par le système nerveux et le traitement de ces odeurs au niveau central sont aussi des sujets d'intérêts couverts par le personnel de NBO. Pour cela le bulbe et le tubercule olfactif, qui sont les deux premiers relais de l'information olfactive, sont considérés car contribuant à la réponse comportementale de l'animal. L'objectif est d'étudier la neuromodulation du signal olfactif aux différents niveaux d'intégration (périphérique et central), les acteurs de cette plasticité (neurones, cellules gliales), et ses mécanismes, dans différents contextes :

- statut nutritionnel et métabolique modifié (jeûne, déséquilibres alimentaires)
- stress (aigu et chronique)
- odorisation périnatale

De la sorte, le suivi des effets induits par ces différents contextes pendant le développement jusqu'à l'âge adulte pourront révéler à quel niveau, aussi bien temporel que morphologique, ces changements impactent le codage des odeurs et le fonctionnement du système olfactif.

SOMMAIRE

Résumé et mots clés	1
Liste des abréviations	2

Introduction

I) Le système olfactif	3
II) Environnement olfactif et plasticité	4
III) Problématique	5
1) Objectif.	5
2) Réalisation du projet.	6
IV) Implication dans le projet.	7

Matériel et méthodes

Modèle d'étude	8
Conditions d'odorisation	8
Open Field	8
Crawling	9
RT-Q PCR	10
Analyse statistique	10

Résultats et Discussion

Open Field	11
1) Distance parcourue	11
2) Temps inside	12
3) Toilettage, freezing et fèces	13
RT-Q PCR	15
Crawling	16
Perspectives	18
Bibliographie	19

Résumé

De nombreuses données montrent que l'environnement olfactif de l'animal peut affecter la plasticité de son système olfactif depuis le niveau de la muqueuse jusqu'au premier relai de l'information, le bulbe olfactif.

Dans le cadre de mon stage, j'ai été impliqué dans un projet visant à évaluer les conséquences d'un enrichissement de l'environnement périnatal sur la plasticité du système olfactif ainsi que les comportements qui lui sont associés chez la souris CD1. Pour cela, des souriceaux ont été exposés à un odorant (heptanal) pendant la période périnatale par le biais de la nourriture maternelle. Des études comportementales de locomotion induite par une odeur et de réponse au stress de séparation maternelle à différents stades de développement des souriceaux en lien avec leur statut maternel, ainsi qu'une étude moléculaire, ont été menées. Les résultats montrent que les animaux sont moins stressés lorsqu'ils sont testés dans leur environnement olfactif périnatal familier au sevrage, mais ne manifestent pas de locomotion préférentielle induite par l'odeur plus jeunes. L'absence de variation du nombre de transcrits du récepteur olfactif sensible à l'heptanal mesurée par qPCR dans la muqueuse olfactive nous permet de faire l'hypothèse que les différences comportementales observées ne sont pas imputables à une variation du nombre de transcrits de ce récepteur.

Mots clés : Odorisation périnatale, Récepteur olfactif, Heptanal, Open field, Souris.

Abréviations

ADN : Acide DésoxyriboNucléique

ADNc : Acide DésoxyriboNucléique complémentaire

ARN : Acide RiboNucléique

BO : Bulbe olfactif

CT : Cycle Threshold

EOG : électro-olfactogramme

FDR : False Discovery Rate

GFP : Green Fluorescent Protein

MO : Muqueuse Olfactive

NBO : Neurobiologie de l'Olfaction

NO : Non Odorisé

NOeMI : Neurobiologie de l'Olfaction et Modélisation en Imagerie

NuRéLiCe : Nutrition et Régulation Lipidique des Fonctions Cérébrales

ODO : Odorisé

OPF : Open Field

OR : Olfactory Receptor

OSN : Olfactory Sensory Neuron

PBS : Phosphate Buffered Saline

PFA : Paraformaldéhyde

PHASE : Physiologie Animale et Système d'Élevage

PN : Postnatal

PRC : Physiologie de la Reproduction et des Comportements

RT-Q-PCR : Reverse Transcriptase Quantitative Polymerization Chain Reaction

SAPS : Sciences Animales Paris-Saclay

SM : Séparation Maternelle

Introduction

D) Le système olfactif

L'olfaction est un sens primordial chez les animaux puisqu'il permet de collecter de nombreuses informations sur leur environnement et est capable d'influencer leur comportement pour les amener à se nourrir, à fuir ou encore se reproduire. Certains mécanismes impliqués dans le traitement de l'information olfactive sont connus depuis peu et leur étude est en plein essor depuis la découverte des récepteurs olfactifs par Linda Buck et Richard Axel (1991). La première étape de perception se situe au niveau des systèmes olfactifs principal et accessoire dans le nez (Figure 1).

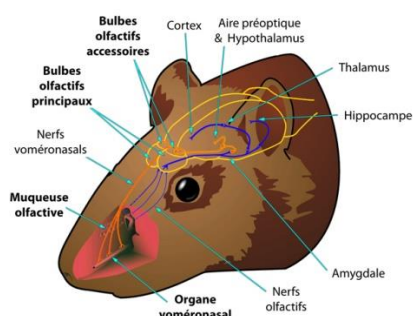


Figure 1 : Schéma général de l'organisation du système olfactif chez la souris. Ici est représenté le système olfactif principal et accessoire, ainsi que les projections nerveuses vers les aires limbiques et corticales.

Dans le système olfactif principal, la muqueuse olfactive (MO) est constituée de cellules neurosensorielles (neurons olfactifs), de cellules de soutien qui ont un rôle de support et de protection, de cellules basales souches pour le renouvellement neuronal et des cellules de soutien, ainsi que de glandes de Bowman sécrétant le mucus (voir figure 2).

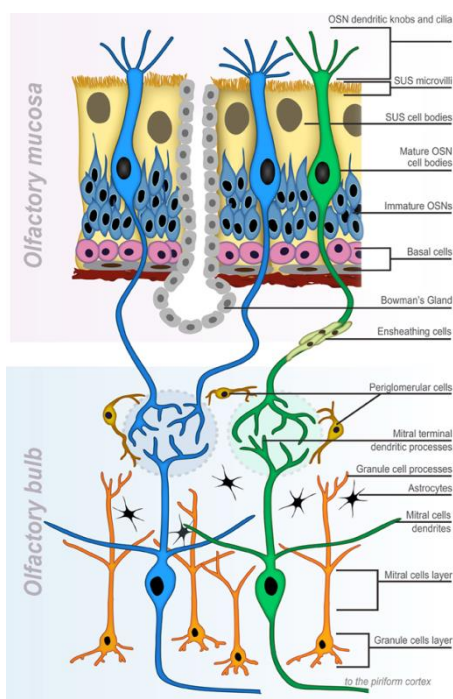


Figure 2 : Représentation schématique de l'organisation de la MO et du BO (Palouzier-Paulignan et al., 2012).

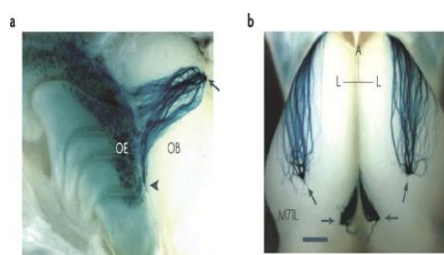


Figure 3 : Exemple de projection des axones de neurones olfactifs exprimant M71-LacZ. On voit en vue sagittale (a) la projection vers le BO et en vue dorsale (b) les 4 glomérules, 2 dorsaux et 2 médians (flèches) (Zou et al., 2009).

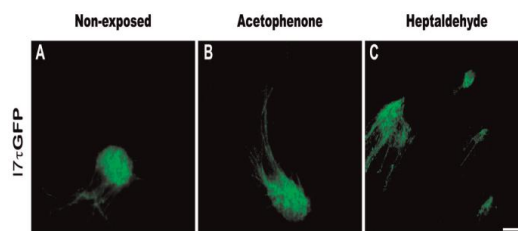


Figure 4 : Effet d'une odorisation chronique post-natale sur le nombre et le volume des glomérules de souris i7-GFP (Valle-Leija et al., 2012).

Le neurone olfactif est un neurone bipolaire terminé par un bouton dendritique porteur de cils non motiles immergés dans une couche de mucus dans lequel les odorants véhiculés lors de l'inspiration sont solubilisés et peuvent alors interagir avec les récepteurs olfactifs (OR) (Firestein, 2001). Les odorants composant une odeur se lient aux récepteurs olfactifs exprimés à la surface du neurone sensoriel olfactif réceptif (OSN) et activent une cascade de transduction qui aboutit à l'émission d'un potentiel d'action qui se propage le long de l'axone. Cet axone se projette dans le bulbe olfactif (BO) à travers la lame criblée (os) dans une structure nommée glomérule (voir figure 2). Le glomérule est une structure sphérique de 150 à 250 μm de diamètre, située dans la périphérie des BOs en une couche spécifique. C'est dans ces glomérules que les axones des OSN font synapses avec les dendrites apicales des cellules mitrales, cellules principales du BO. En périphérie se situent des cellules périglomérulaires (interneurones) qui modulent la transmission de l'information entre les OSN et les cellules mitrales.

Afin de comprendre la connectivité et la plasticité des projections des axones des OSN dans le BO, des lignées de souris transgéniques exprimant un OR portant une séquence rapportrice ont été générées. Elles ont permis de montrer que, bien que les OSN isoréceptifs soient dispersés sur la surface de l'épithélium, les axones provenant des OSN exprimant le même OR convergent tous vers une même structure pour former ensemble des glomérules exclusifs (Treloar et al., 2002). Dans la plupart des cas, les OSN projettent sur les 2 héli-BO vers 2 glomérules distincts (voir Figure 3). Chez la souris adulte, il y a 5 à 10 millions d'OSN exprimant plus de 1300 OR différents dans l'épithélium olfactif pour 1800 glomérules dans le BO ce qui revient à une convergence de 10^3 entre les axones des neurones olfactifs et les glomérules (Firestein, 2001). La taille des glomérules dans le BO est corrélée au nombre d'OSN correspondants dans la MO (Bressels et al., 2015).

II) Environnement olfactif et plasticité

La mise en place et le fonctionnement du système olfactif, tel que décrit ci-dessus, et des comportements associés présentent une plasticité fonctionnelle très importante au cours de la vie de l'animal en lien avec son expérience, en particulier la présence d'odeurs. Un enrichissement olfactif périnatal via l'alimentation ou l'environnement entraîne une plasticité fonctionnelle induite par l'activité olfactive dans le système olfactif (MO et BO) et résulte en une modification des comportements liés à l'olfaction (Logan DW et al., 2012). Ceci est lié au fait que certaines odeurs peuvent traverser les barrières physiologiques et se retrouver dans le placenta ou le lait et que le système olfactif est

fonctionnel avant la naissance. Cette empreinte olfactive liée à l'environnement de l'individu pendant son développement peut également perdurer après le sevrage. En particulier, l'odorisation périnatale peut entraîner une modulation de la sensibilité olfactive conditionnant des comportements comme l'acceptabilité alimentaire (Nicolaidis S et al., 2008), la néophobie (Ventura AK et al., 2013) et la réponse au stress (Oostindjer M et al., 2011) chez le jeune ou l'adulte. Les effets peuvent être modifiés par l'expérience post-natale précoce, ce qui influence les comportements de préférence à long terme (Hepper et al., 2012), voire allège la réponse innée à des odeurs stressantes (Matsukawa et al., 2016). Sur le plan mécanistique, l'odorisation périnatale affecte le système olfactif à divers niveaux, bien que de nombreuses controverses persistent. Selon les cas (type d'odorant, concentration, type et fenêtre d'exposition, etc.), on observe une augmentation du nombre de neurones réceptifs à l'odorant ciblé dans la MO (après apprentissage, Jones 2008) ou une baisse (Cavallin, 2010 ; Cadiou 2014), une augmentation de la sensibilité à l'odorant mesurée par électro-olfactogramme EOG (Wang, 1993, mais fait sur des souris anosmiques) ou pas (Cadiou et al., 2014) qui s'accompagne de modifications structurales des glomérules comme l'augmentation du volume (Todrank et al., 2011), l'apparition de glomérules surnuméraires (Valle-Leija et al., 2012) pouvant modifier le traitement de l'information olfactive. Une autre étude montre que certaines de ces modifications ne sont observées qu'après un conditionnement aversif à l'odorant (Kerr and Belluscio, 2006).

III) Problématique

Les effets de l'odorisation périnatale sur l'animal semblent donc multiples et complexes et sont étudiés dans l'unité NBO dans un projet sur 3 ans, débuté en 2014, portant sur l'effet d'une odorisation périnatale sur le développement des préférences alimentaires chez l'animal et sur les mécanismes de neuromodulation. Deux espèces servent à l'étude de ces mécanismes : la souris et l'ovin.

1) Objectif

Le projet évalue les conséquences d'un enrichissement de l'environnement périnatal sur la plasticité du système olfactif ainsi que les comportements qui lui sont associés, sur des souris transgéniques mi7 (Bozza et al., 2002). La spécificité de cette lignée réside dans le remplacement d'un gène codant pour l'OR olfR2 (I7) par la séquence du récepteur identique auquel a été ajouté la séquence du gène de la GFP en partie 3'. Son ligand préférentiel est l'heptanal. Les neurones exprimant I7 sont fluorescents et visibles

en microscopie, situés dans la zone médiane de l'épithélium olfactif chez l'adulte (Bozza et al., 2002). Ils projettent leurs axones vers deux glomérules I7 : un médian et un ventral, déjà formés à la naissance. Lors d'une odorisation post-natale, des glomérules surnuméraires peuvent apparaître (Valle-Leija, 2012 ; voir figure 4). Ils résultent d'une modification de la position de la convergence glomérulaire à la surface du BO, du nombre total d'OSN exprimant le même OR ou de la variabilité d'expression du même OR par une population de neurones donnée. C'est un modèle encore peu étudié sur le plan mécanistique, comportemental à court et long terme. Les deux premiers étages d'intégration du signal olfactif, la MO et le BO, sont considérés dans le projet.

2) Réalisation du projet

Le projet se compose en **5 tâches** (Voir chronogramme annexe), dont la tâche 5 qui concerne une expérimentation sur l'ovine n'est pas évoquée ici.

A mon arrivée, la **tâche 1** (mise en place d'un protocole d'odorisation pré et post-natal chez la souris, vérification de la présence de l'heptanal dans les fluides biologiques maternels (liquide amniotique, lait)) était faite. Mais, du fait de difficulté dans l'élevage des souris transgéniques mi7, l'équipe avait modifié le protocole initial, avec l'adoption à la naissance des souriceaux mi7 par des mères adoptives CD1 odorisées dans les mêmes conditions. Les travaux étaient donc réalisés en parallèle avec des souriceaux mi7 adoptés pour les études moléculaires et des souriceaux CD1, pour les études comportementales.

La **tâche 2** consistant en l'observation de l'effet de l'odorisation sur les performances de l'animal et les préférences alimentaires, était en cours à divers âges, en testant l'effet de l'odorisation sur la préférence olfactive et sur la réaction au stress. Les tests déjà réalisés à PN3 (orientation de la tête, AlAin et al., 2013) et PN12 (test de choix) n'indiquaient aucun effet de l'odorisation maternelle sur la préférence olfactive des animaux nés de mère odorisée quelle que soit la souche. En revanche, à PN21, les mi7 issues de mères odorisées avaient une préférence olfactive prononcée dans ce dernier test, alors que les CD1 étaient très stressées par cette expérimentation. Un test de réaction au stress de séparation maternelle (SM) réalisé en open-field non odorisé (OPF) sur les souriceaux CD1, à PN21, indiquait que les animaux nés de mères odorisées étaient plus sensibles au stress de SM que les animaux issus de mères non odorisées (figure 5), en particulier si la SM était réalisée en présence de l'odorant. Ceci suggérait que le stress était lié à la « perte » de repère olfactif dans l'environnement des animaux lors de l'OPF :

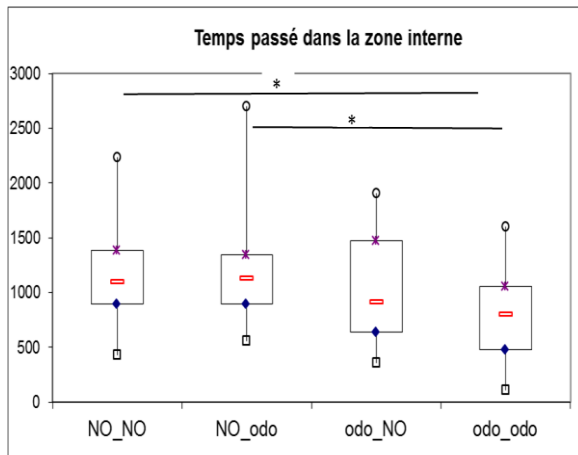


Figure 5 : Analyse en box plot du test en OPF non odorisé. En abscisse sont indiquées les conditions des souriceaux testés et en ordonnée le temps passé dans la zone interne (frames), qui est inversement proportionnel au niveau de stress. On observe que les animaux issus de mères non exposées à l'odeur d'heptanal (NO-NO, n=54; NO-ODO, n=30) passent significativement plus de temps dans la zone interne du dispositif par rapport au groupe ODO-ODO (n=21), mais ne sont pas différents du groupe ODO/NO (n=50). Les animaux NO sont donc moins stressés que les animaux ODO dans un OPF non odorisé.

Les tâches 3 et 4 concernent l'identification et l'étude des mécanismes moléculaires de neuromodulation de la réponse olfactive après odorisation périnatale, indiquaient que l'odorisation abaissait le niveau de transcription du gène *i7* à PN21, et entraînait l'apparition de glomérules surnuméraires par imagerie confocale à PN12.

IV) Implication dans le projet

Dans le cadre de mon stage, j'ai été particulièrement impliqué dans deux axes du projet sur le modèle CD1.

A. Comportemental (Tâche 2 du projet) : Etudier l'effet de l'odorisation périnatale sur :

1) la préférence olfactive en mettant au point un nouveau test dit de « crawling » basé sur un indice de déplacement vers une source odorante (Mendez-Gallardo et al., 2013) sur des souriceaux quelques jours après la naissance. Les essais préliminaires à PN 0-1 avaient montré que les souriceaux étaient trop immatures sur le plan locomoteur pour se déplacer facilement vers une source odorante.

2) la réaction au stress dans un environnement odorisé, en complément des données déjà obtenues en OPF dans l'enceinte non odorisée à PN21. Mon but ici est de tester la réaction des animaux dans un environnement odorisé, mais aussi de mesurer certains paramètres liés au stress ne pouvant pas être mesurés via l'ordinateur tels que le temps de toilettage et le « freezing ».

B. Moléculaire (Tâche 3) : Etudier l'effet de l'odorisation sur la sensibilité olfactive des souriceaux en mesurant le niveau de transcription du gène *i7* dans la MO de souriceaux CD1 à PN23, 2 jours après l'OF, pour les comparer aux données obtenues en OF NO.

Matériel et méthodes

-Modèle d'étude : Les animaux CD1 (Janvier) utilisés pour les expérimentations sur la plasticité olfactive sont élevés dans trois cellules distinctes : la première héberge les animaux qui servent aux accouplements et au maintien des souris mâles et femelles adultes progénitrices. De manière à dater précisément la gestation, les accouplements sont contrôlés par la présence d'un bouchon vaginal.

-Conditions d'odorisation : Huit jours après l'observation du bouchon vaginal, les souris gestantes sont transférées par moitié dans une cellule où elles sont nourries avec de la nourriture contrôle ou dans une cellule dans laquelle la nourriture des souris est odorisée. L'odorisation se fait par le biais de la nourriture (croquettes) imbibées d'heptanal 1/10 dilué dans l'éthanol ou d'éthanol seulement (contrôle), car non miscible dans l'eau, à raison de 40 mL pour 500g de croquettes. La nourriture est laissée la nuit sous sorbonne avant d'être données aux animaux en quantité suffisante et est changée chaque lundi, mercredi et vendredi. Dans la mesure où la consommation de nourriture des souris est corrélée à leur poids, les souris gestantes ont 30g (CD1) et les souris lactantes ont entre 50 et 70g de croquettes pour 2 jours.

-Open Field : Le test en champ ouvert, dit « open-field » (OPF), est utilisé pour mesurer le niveau de stress ainsi que la volonté d'explorer un environnement nouveau, en quantifiant l'activité exploratoire et comportementale (locomotion, thigmotaxie, toilettage, défécations). Une boîte carrée de 55 x 55 x 35 cm en plastique noir mat, est disposée dans une pièce éclairée et fermée. Les souriceaux sont positionnés un à un au centre de l'OPF et sont laissés pendant 5 minutes. Une caméra placée au-dessus de la boîte enregistre leur parcours, ce qui permet ultérieurement d'évaluer leur comportement à l'aide d'un logiciel « Mice-Tracking » conçu au laboratoire. Son principe repose sur l'utilisation d'un curseur qui enregistre la position du souriceau dans l'OPF sur le film. Le format de la vidéo est converti en « avi. » pour être lu par le logiciel. Ensuite, le fond de la vidéo (sauf OPF) est soustrait et apparaît en filigrane (figure 6). En faisant cela, le seul élément mobile de la vidéo restant est le souriceau. Sa position peut donc être suivie. Le logiciel est programmé en définissant 1) le temps de lecture : durée pendant laquelle la position de la souris est enregistrée (5 minutes), 2) Le cadre de lecture : zone dans laquelle le curseur va se déplacer, 3) Une zone interne et une zone externe. La zone interne représente l'intérieur

d'un carré dont le côté mesure 2/3 de la diagonale de l'OPF (Figure 6). La zone extérieure à ce carré constitue la zone externe.

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

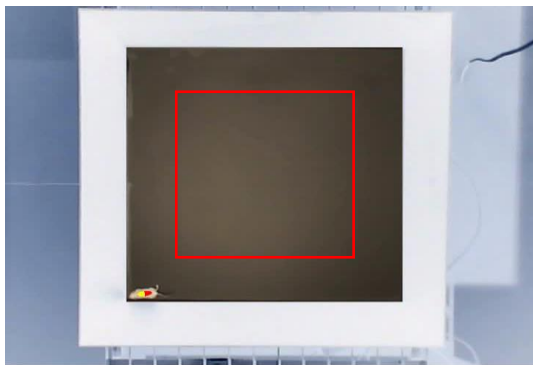


Figure 6 : Dispositif d'OPF. Le fond de la vidéo a été retiré et apparaît en filigrane. Il ne reste que la zone de l'OPF où le souriceau peut se déplacer. Les zones interne/externe sont définies en traçant le carré ayant pour côté 2/3 de la longueur de la diagonale de l'OPF (carré rouge). Le curseur est ensuite placé sur le souriceau pour enregistrer ses déplacements (point rouge). Les rongeurs, lorsqu'ils sont stressés, veulent fuir et longent les parois dans le but de trouver une sortie. Ainsi un animal stressé va très peu explorer le centre de l'OPF ce qui donnera un temps inside faible.

Ce test a été réalisé dans les conditions suivantes :

Des souriceaux de 21 jours nés de mères non odorisées (NO) ou odorisées (ODO) sont séparés de leur mère 4 heures avant le test en isolant chaque petit dans une cage individuelle sans litière, sans nourriture et sans eau, dans une pièce non odorisée ou odorisée par de l'heptanal 1/10 (40 uL sur 8 papiers filtre répartis dans la pièce et changés régulièrement). Des groupes distincts sont définis selon l'odorisation maternelle des souriceaux (NO ou ODO, 1^{er} terme) et selon la pièce de séparation dans laquelle les souriceaux sont isolés (NO ou ODO, 2nd terme), ce qui donne 4 groupes : NO/NO ; NO/ODO ; ODO/NO et ODO/ODO. Le test est réalisé dans une pièce odorisée par de l'heptanal de la même manière que dans la pièce de séparation. Entre chaque animal, le dispositif est nettoyé à l'eau. Le nombre de fèces émis pendant la séparation est compté et leur sexe est déterminé. Durant chaque étape, les souriceaux sont manipulés par la queue.

-Crawling : Ce test de comportement olfactif consiste en l'observation du caractère attractant ou repoussant d'une odeur chez un raton à la naissance en l'exposant à cette odeur au niveau de son museau et en mesurant la distance parcourue en rampant par l'animal (Mendez-Gallardo et al., 2013). Ici, des souriceaux à PN5-6 sont séparés 2 par 2 de leur mère trente minutes avant le test dans une cage avec de la sciure, sous lampe chauffante pour maintenir la température corporelle. Chaque souriceau est ensuite placé sur une réglette en métal recouverte d'un papier gaufré, posée sur un coussin chauffant à 37°C pour éviter qu'il se refroidisse, maintenu très légèrement au niveau de ses flancs. Un tube

contenant une odeur est placé à la hauteur de son museau afin qu'il puisse la sentir. Si le souriceau perçoit l'odeur comme attractive, il va ramper en direction de l'odeur. Le tube est reculé au fur et à mesure de l'avancée de l'animal, sans exercer de forces latérales sur le museau du souriceau. Si le souriceau bascule, sa tête est replacée dans le tube et le test se poursuit. Le temps nécessaire à l'initiation du premier mouvement est noté (temps de latence, seconde) et la distance totale parcourue (cm) est mesurée sur 1mn30 de test.

-RT-Q PCR : La RT-Q PCR (reverse transcription- réaction en chaîne par polymérase en temps réel quantitative) permet de quantifier une expression génique via la quantification des ARN. Dans l'optique de mesurer un effet de l'odorisation chez la souris, les ARN ont été extraits à partir de MO et purifiés (kit RNeasy® Mini Kit de QIAGEN®). Après dosage en spectrophotométrie sur NanoDrop (ng/uL) et traitement à la DNaseI pendant 20 minutes à 4°C pour éliminer par hydrolyse l'ADN résiduel, Les ARN purifiés sont rétro-transcrits afin d'obtenir leur ADNc. Les ADNc (120 ng) sont amplifiés à l'aide d'amorces des gènes d'intérêt (tableau 1 annexe) en présence Sybr green dans un volume total de 20 uL dans une plaque 96 puits. Un film a été thermocollé sur la plaque puis celle-ci a été introduite dans le thermocycleur. La valeur Ct (cycle threshold) donnée par l'appareil représente le seuil de détection du transcrit. Un ΔCT ($Ct_{\text{gène d'intérêt}} - Ct_{\text{gène ménage}}$) est calculé pour chaque gène et chaque condition expérimentale. Puis le facteur d'amplification entre les deux conditions est calculé ($2^{\Delta CT}$).

-Analyse statistique : Les résultats obtenus en OPF ont été analysés par ANOVA globale sous R par le calcul suivant : `> anova.vincentT3<-(lm(T.inside~Manip+Mère+Sexe+Condition1*Condition2, data=vincentT3))`. Cela permet de déterminer des effets liés au jour d'expérimentation, à la mère, au sexe et aux conditions des souriceaux sur les paramètres étudiés et l'interaction entre les conditions 1 et 2. Par la suite les données ont été traitées par T test et les p-values ont été corrigées par False Discovery Rate (FDR). Les autres résultats ont été traités par T test et correction FDR. Du fait de leur complexité, les analyses sous R ont été menées par des chercheurs de l'unité.

Résultats et Discussion

OPF : Trois expériences d'OPF odorisé, réparties sur trois jours différents, ont été réalisées dans les mêmes conditions (voir matériel et méthodes). Les souriceaux se répartissent en quatre groupes selon l'exposition nutritionnelle durant la phase périnatale (NO ou ODO, 1^{er} terme) et l'exposition environnementale de la salle de séparation avant le test (NO ou ODO, 2nd terme). 52 animaux ont été testés provenant de 6 mères ODO ou NO, les effectifs sont résumés ci-dessous :

Effectif Date	Mère	NO- NO	NO- ODO	ODO-NO	ODO- ODO	Total
19/04/16	B2	5	4			9
19/04/16	D5, D49			5	4	9
02/05/16	D47, D71	4	3			7
02/05/16	D30, D22			3	3	6
03/05/16	D47, D71, D13	6	9			15
03/05/16	D30, D22			3	3	6
Total	8	15	15	11	10	52
Sexe ratio		53% ♀	53% ♀	55% ♀	40% ♀	

Le logiciel « Mice-Tracking » a permis de calculer automatiquement la distance totale parcourue et le temps passé à l'intérieur (inside) de la zone délimitée dans l'arène. Les temps de toilettage et freezing ont été comptés manuellement, ainsi que le nombre de fèces émis lors de la SM. L'étude statistique des résultats a débuté par l'étude des interactions entre les paramètres mesurés et le sexe de l'animal, la mère et le jour de l'expérimentation à l'aide d'une ANOVA sous R. Aucun effet lié au sexe ayant été identifié, les données rassemblent mâles et femelles. Il a été identifié une interaction entre la distance parcourue et la date de l'expérimentation. Il n'y a pas d'interaction entre le temps passé « Inside » et les autres paramètres (date de la manip), mais un effet de la mère. Nous pouvons donc regrouper les données du temps passé dans la zone interne des trois expérimentations. Les autres facteurs sont traités séparément selon la date de l'OPF.

1) Distance parcourue

L'étude de la distance totale parcourue par les animaux au cours du test en OPF a été menée dans le but de déterminer si chaque souriceau de chaque groupe a parcouru une distance comparable pendant les 5 minutes dans l'OPF. En effet, si un groupe parcourt une distance différente d'un autre, alors le temps passé dans la zone interne ne dépend plus

seulement des conditions intrinsèques de ce groupe mais dépend de son activité locomotrice globale. D'après l'analyse sous R, la distance totale parcourue par les animaux varie selon le jour de l'expérimentation ($p=0,009$). C'est pourquoi, les distances parcourues par les souriceaux ont été analysées jour par jour (figure 7) :

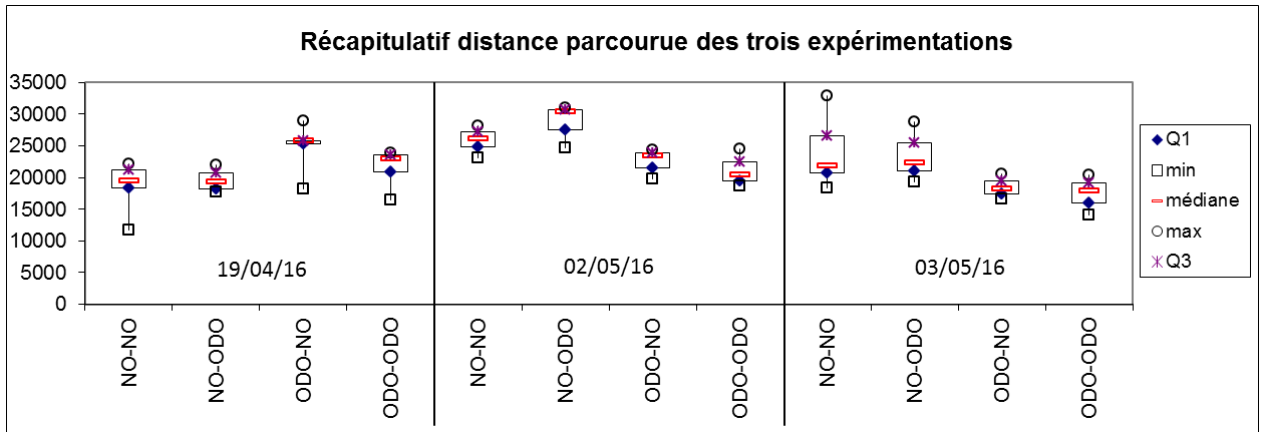


Figure 7 : Analyse en box plot des distances parcourues en OPF par chaque groupe de d'animaux au cours des 3 expérimentations. En abscisse sont indiquées les conditions des souriceaux, en ordonnée la distance parcourue en pixels

L'analyse statistique corrigée des FDR (False Discovery Rate) ne montre aucune différence significative entre les distances totales parcourues par les souriceaux des 4 groupes testés le même jour, ce qui permet de les comparer entre eux. Le statut d'odorisation des animaux ne semble pas jouer sur leur niveau d'activité.

2) Temps inside

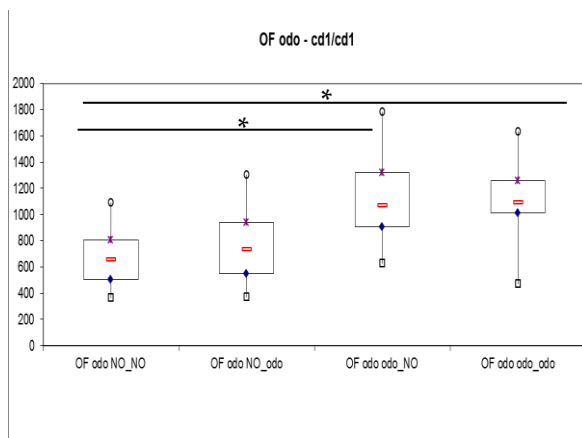


Figure 8 : Analyse en box plot du temps passé dans la zone interne par les souriceaux en OPF ODO. En abscisse sont indiquées les conditions des souriceaux et en ordonnée le temps passé dans la zone interne en frame.

Après étude statistique et correction des FDR, les résultats des trois jours d'expérimentations en OPF odorisé (figure 8) montrent que les animaux ODO passent significativement plus de temps dans la zone interne que les animaux NO ($p<0,05$), quel que soit leur statut au moment de la SM. Les animaux ODO passant plus de temps au

centre du dispositif, seraient moins stressés en présence de l'odeur d'heptanal. De plus, on note une absence de différence significative entre les deux groupes NO, ainsi qu'entre les deux groupes ODO, ce qui montre que la condition dans laquelle la SM se déroule n'influence pas le temps passé dans la zone interne. Nous pouvons alors rassembler les deux sous-groupes (1^{er} terme NO ou ODO) sans tenir compte des conditions odorantes lors de la SM. Comme cette observation avait été également notée dans l'OPF non odorisé pour le groupe NO, nous pouvons comparer les OPF NO et ODO pour le temps passé dans la zone interne en rassemblant les lots selon la condition d'odorisation maternelle sans tenir compte des conditions de SM (figure 9).

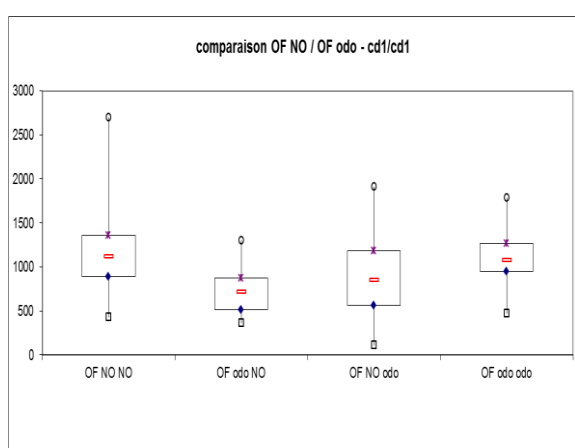


Figure 9 : Analyse en box plot de la comparaison du temps passé dans la zone interne entre les animaux testés en OPF NO et en OPF ODO. En abscisse sont indiquées les conditions des sourceaux et en ordonnée le temps passé dans la zone interne en frame.

On observe que le temps passé dans la zone interne par les sourceaux NO dans l'OPF NO n'est pas différent de celui des sourceaux ODO dans l'OPF ODO. Il y a une tendance pour les animaux issus de mère NO à passer moins de temps inside entre l'OF NO et ODO (stress augmenté) et une tendance pour les animaux issus de mère ODO à passer plus de temps Inside entre l'OF NO et ODO (stress diminué). Ainsi, les sourceaux sont moins stressés dans l'OPF dont le statut d'odorisation correspondant à leur environnement odorant familial. L'heptanal 1/10 serait associé par l'animal avec l'odeur maternelle ou celle du nid, ce qui participerait à la diminution du stress chez les animaux issus de mère exposée à l'odorant dans le cadre des OPF odorisés.

3) Toilettage, freezing et fèces

D'autre part, d'autres paramètres comme le temps de toilettage ou le temps de « freezing » (animal immobile) ont été mesurés manuellement, en frames. Les sourceaux en « freezing » n'ont été que très peu nombreux (3/52) et le temps qu'ils ont passé immobiles est très variable. Le comptage du nombre de fèces émises pendant la séparation

de 4h avant le test en OPF montre que le nombre moyen de fèces est proche entre les différents groupes d'animaux avec des écart-types important (tableau 2 annexe). Il n'y a donc pas d'effet de l'odorisation périnatale ni de la séparation maternelle sur la défécation des souriceaux. Ces deux paramètres ne semblent pas être pertinents dans le cadre de notre étude.

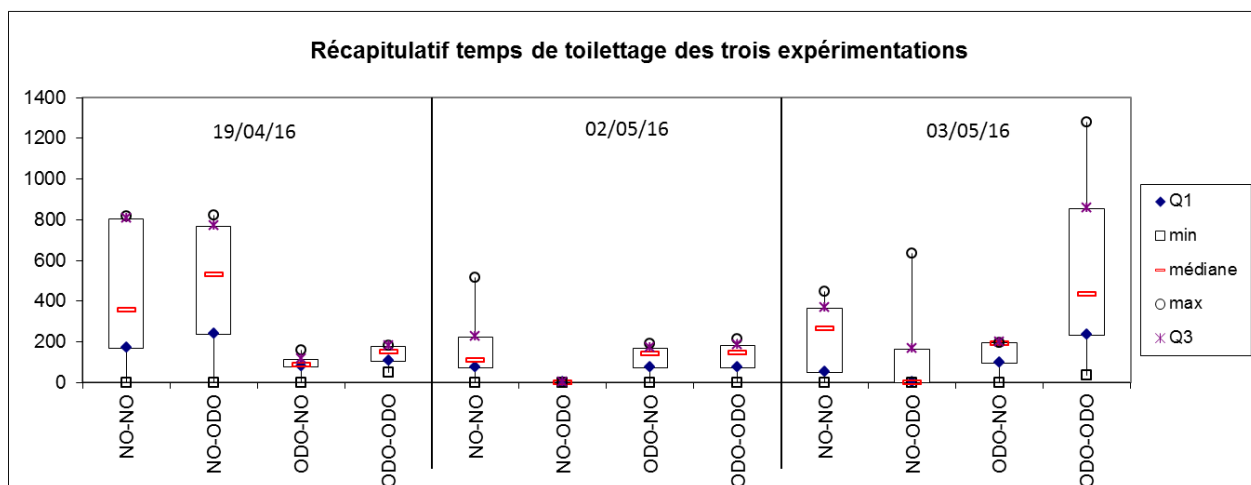


Figure 10 : Analyse en box plot des temps de toilettage des trois expérimentations. Sur ce graphique, on observe le temps de toilettage de chaque groupe d'animaux au cours des 3 expérimentations. En abscisse sont indiquées les conditions des souriceaux, en ordonnée le temps de toilettage en frame

Le comportement de toilettage a été beaucoup plus fréquent que le freezing chez les souriceaux (39/52), mais le temps passé au toilettage est extrêmement variable d'un individu à un autre (figure 10). L'analyse des données montre une interaction entre le temps de toilettage et le jour où les expérimentations ont été effectuées ($p=0.043$), mais pas d'interaction avec le statut de la mère ou le statut du souriceau pendant la séparation. Ainsi, on en conclut que l'odorisation périnatale n'a pas d'effet sur le temps de toilettage des souriceaux dans l'OPF.

On doit noter que les 3 paramètres de comportement étudiés manuellement (freezing, toilettage, fèces), même s'ils ne sont pas différents entre les groupes, impactent nécessairement les paramètres « temps Inside » et « distance totale parcourue ». Il serait intéressant de reprendre chaque individu pour mesurer les corrélations possibles entre ces différents paramètres.

Le comportement de réaction au stress des souriceaux est sensible à l'environnement odorant, mais contrairement à notre hypothèse de départ, les conditions de SM n'ont pas eu d'influence sur les paramètres mesurés. Il est peu probable que la SM n'ait pas activé l'axe corticotrope comme déjà montré à cet âge (Nishi et al., 2014). Or, la

cinétique de libération de CORT suite à un stress chronique est influencée par l'odorisation environnementale à 4h et 7h chez le porcelet (Oostingler et al., 2011). Le laps de temps choisi (4h) entre la MS et l'OPF est peut-être trop long chez la souris pour permettre de mettre en évidence des différences de réactivité liées à l'odorisation.

q-PCR : Dans l'optique de rechercher des différences de sensibilité olfactive permettant d'appuyer la réponse différentielle des animaux NO et ODO dans l'OPF, les animaux ont été remis avec leur mère pour 48h de récupération après la sortie de l'OPF, avant d'être sacrifiés à PN23 pour prélever les MO. Après extraction et rétro-transcription des ARN en ADNc, une mesure du niveau de transcription du gène *i7* codant pour le récepteur de l'heptanal a été effectuée par PCR quantitative en temps réel en comparaison d'autres gènes (tableau amorces en annexe).

28 échantillons prélevés chez 14 souriceaux NO-NO et 14 ODO-ODO ont été analysés en duplicats pour chaque gène. Les résultats obtenus devaient être normalisés avec deux gènes « de ménage » (ARN18S et *Suclg*) pour la transcription du gène *i7* (gène cible de notre étude), *olfr56* (autre gène de récepteur olfactif), et β -tubulineIII (marqueur des neurones matures). Seuls 10 NO-NO et 11 ODO-ODO issus de 4 femelles différentes pour chaque condition ont donné des résultats exploitables (certains échantillons étaient dégradés), et la normalisation a été faite avec *Suclg*, l'ARN18S étant trop variable.

La Figure 11 indique que le niveau de transcription du gène *i7* n'est pas significativement différent entre les MO des animaux ODO-ODO ou NO-NO à PN23 après normalisation ($p=0,9$), ni celui du gène de l'*Olfr56* ($p= 0,1$) (non montré). En revanche, on observe une augmentation significative dans le niveau de transcription du gène de la β -tubuline normalisé ($p= 0,035$) dans les MO des animaux odorisés d'un facteur 3,6.

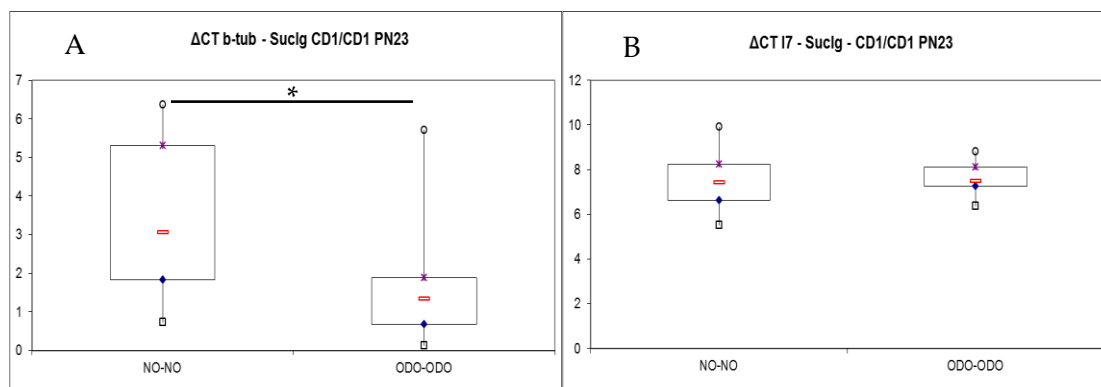
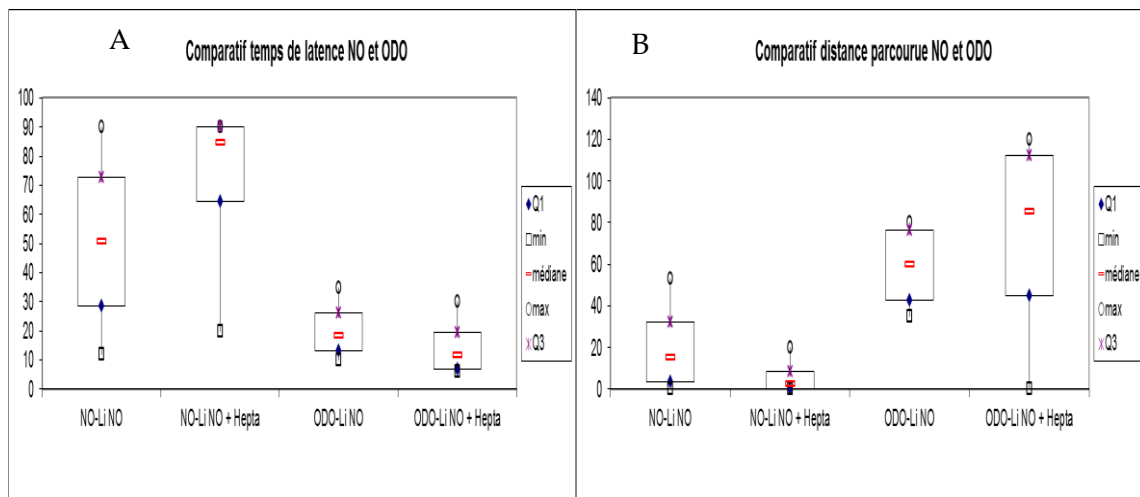


Figure 11 : Analyse en box plot des niveaux de transcrit de la β -tubuline (A) et de *i7* (B) et normalisés par rapport au gène de ménage *Suclg* (exprimé en ΔCT).

Ainsi, le niveau de transcription du gène *i7* à PN23 n'est pas modifié par l'odorisation périnatale des souriceaux CD1 à l'heptanal, ce qui suggère une même sensibilité à cet odorant dans les deux groupes, même si l'absence de différence au niveau du transcrit ne reflète pas forcément la réactivité de l'OSN. Sur les souris *i7*-GFP dans les mêmes conditions d'odorisation, on observe une baisse de la transcription du gène *i7* et du gène de la β -tubuline à PN21, suite à des tests de choix odorant. La raison de cette différence entre les deux lignées n'est pas connue. Selon les modèles, l'odorisation périnatale induit une augmentation du nombre de neurones réceptifs à l'odorant utilisé (Jones et al., 2008) ou une baisse (Cavallin et al., 2010 ; Cadiou et al., 2014), sans modification de la sensibilité globale à l'odorant par EOG, mais une différence en patch-clamp sur OSN isolés (Cadiou et al., 2014). D'autres investigations doivent être menées sur ces 2 modèles pour les comparer.

Crawling : Les tests de crawling avant PN3 n'étant pas très concluants, (voir introduction), nous avons travaillé à partir de PN 3, car les animaux semblent être plus robustes, capables de sentir l'odeur dans le tube et d'avancer dans sa direction. Différentes matrices ont été testées (lait de souris, de vache, croquette, litière) sur quelques animaux. La litière d'une mère non familière NO semble être la meilleure matrice et peut être obtenue facilement. Elle a été choisie pour tester des souriceaux NO-NO et ODO-ODO vis-à-vis d'une litière non familière odorisée à l'heptanal 10^{-6} M ou pas (n=4 pour chaque test) sur deux jours d'expérimentation.



c

Même si les effectifs sont faibles et que l'expérience a été conduite indépendamment sur les animaux ODO et NO (effet jour), les résultats de ce test (figure 12) ne montrent aucun effet de l'odorisation de la litière sur les performances (latence,

distance parcourue) des animaux. Les 2 lots d'animaux sont également motivés par les deux litière NO et NO+Heptanal. On observe une tendance sur le temps de latence au démarrage plus faible et sur la distance parcourue plus importante chez les animaux ODO quel que soit la source odorante utilisée ($p=0,055$). Intuitivement, ces deux paramètres semblent reliés puisque les animaux initiant leur mouvement plus tôt peuvent parcourir une distance plus importante dans le temps imparti de 1 min 30. De plus, les souriceaux ODO montrent une réactivité plus importante puisqu'ils ont tous initié un mouvement (8/8) contre seulement 5/8 pour le groupe NO. Nous sommes donc parvenus à mettre en place un test de locomotion médié par l'olfaction chez le souriceau avec de la litière comme matrice, de manière similaire à l'article de Mendez-Gallardo chez le raton avec du lait et du liquide amniotique (Mendez-Gallardo et al., 2014). Mais nous n'avons pas obtenu d'effet différentiel. Alors que la litière est couramment utilisée dans des tests de motivation chez la souris (Lemasson et al., 2005), mais souvent en test de choix lorsqu'il s'agit de mesurer la préférence olfactive (Morrison et al., 2013). Avant de conclure, le nombre d'animaux testés doit être augmenté, le design expérimental et les paramètres considérés sont également à revoir. D'un point de vue méthodologique, nous avons observé que des traces odorantes laissées par les animaux précédemment testés sur le papier ou sur le bord des tubes peuvent interférer avec la motivation des animaux. Il faudrait utiliser un dispositif plus facilement nettoyable entre deux animaux. De plus, il serait intéressant de tester plusieurs concentrations d'heptanal ou d'autres odorants jusqu'à l'obtention d'une différence dans la réponse à ces odorant entre les groupes NO et ODO.

Perspectives

Lors de mon stage, j'ai participé à l'avancement du projet d'odorisation périnatale sur deux aspects (analyse comportementale et moléculaire) sur les souris CD1.

Au niveau comportemental, afin d'affiner les résultats obtenus en OPF, il serait intéressant de mesurer l'évolution des marqueurs de stress comme le taux de cortisol sanguin ou salivaire (Oostindjer M., 2011) durant la phase de séparation des animaux avant l'OPF pour optimiser sa longueur. Il faudrait aussi réaliser un OPF sans séparation préalable, et un OPF avec un autre odorant non connu des animaux, pour vérifier si l'effet est spécifique de l'odorant utilisé.

Les tests de « crawling » sont prometteurs mais doivent être complétés en augmentant le nombre d'individus testés. Il serait intéressant de faire une courbe dose-réponse puis d'utiliser d'autres odorants pour vérifier la spécificité de l'effet en testant d'autres concentrations.

D'un point de vue mécanistique, l'odorisation n'affecte pas le nombre de transcrit *i7* dans la MO, contrairement aux animaux de la lignée *i7*-GFP traités dans les mêmes conditions. En absence d'anticorps contre *i7*, il est difficile de conclure sur l'absence d'effet et sur les causes des différences entre les 2 lignées. Dans le but de déterminer si une différence de sensibilité olfactive existe chez les souriceaux, des EOGs pourront être menés sur des MO de CD1 stimulées à l'heptanal. Le comptage du nombre de neurones *i7* ou la cartographie des projections des OSN dans le BO en imagerie fonctionnelle sur la lignée de souris transgénique *mi-7* possédant le glomérule *i7* marqué à la GFP facilitera l'analyse mécanistique difficile à réaliser sur les CD1.

L'étude en q-PCR nous montre que l'odorisation périnatale augmente le niveau d'expression de la β -tubuline, marqueur des OSN matures dans les souris CD1. Afin de déterminer l'origine de cette augmentation d'expression, il faudrait mesurer la variation du niveau d'expression de la protéine par Western Blot ou immunohistochimie sur coupe de MO avec un anticorps anti β -tubuline et quantifier les autres marqueurs cellulaires de la MO.

Dans l'optique de dissocier l'effet de l'odorisation pré et post natale, des souriceaux nés de mère NO vont être adoptés par une mère ODO et réciproquement. Ces animaux dit « contrariés » seront utilisés dans les futures expérimentations. Ainsi, nous pourrions dissocier l'effet de l'exposition pré- et post-natale des souriceaux à l'odorant.

Bibliographie

Al Aïn S, Belin L, Schaal B, Patris B How does a newly born mouse get to the nipple? Odor substrates eliciting first nipple grasping and sucking responses. *Dev Psychobiol.* 2013 Dec;55(8):888-901. doi: 10.1002/dev.21082.

Bozza T, Feinstein P, Zheng C, Mombaerts P. Odorant receptor expression defines functional units in the mouse olfactory system. *J of Neuroscience*, Apr 15, 2002, 22(8):3033-3043

Bressel OC, Khan M, Mombaerts P. Linear correlation between the number of olfactory sensory neurons expressing a given mouse odorant receptor gene and the total volume of the corresponding glomeruli in the olfactory bulb. *J Comp Neurol.* 2016 Jan 1;524(1):199-209. doi: 10.1002/cne.23835.

Buck L, Axel R. 1991. A novel multigene family may encode odorant receptors : a molecular basis for odor recognition. *Cell.* 65 :175-187. doi: 10.1016/0092-8674(91)90418-X.

Cadiou H, Aoudé I, Tazir B, Molinas A, Fenech C, Meunier N, Grosmaître X. Postnatal odorant exposure induces peripheral olfactory plasticity at the cellular level. *J Neurosci.* 2014 Apr 2;34(14):4857-70. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0688-13.2014.

Cavallin MA, Powell K, Biju KC, Fadool DA. State-dependent sculpting of olfactory sensory neurons is attributed to sensory enrichment, odor deprivation, and aging. *Neurosci Lett.* 2010 Oct 11;483(2):90-5. doi: 10.1016/j.neulet.2010.07.059.

Firestein S. 2001. How the olfactory system makes sense of scents. *Nature.* 413:211-218. doi: 10.1038/35093026.

Hepper PG., Wells D.L., Millsopp S., Kraehenbuehl K., Lyn S.A. and Mauroux O. Prenatal and early sucking influences on dietary preference in newborn, weaning, and young adult cats. *Chem. Senses* 37: 755–766, 2012.

Kerr, M. A. & Belluscio, L. Olfactory experience accelerates glomerular refinement in the mammalian olfactory bulb. *Nature Neuroscience* 9(4):484-6. 2006.

Logan DW, Brunet LJ, Webb WR, Cutforth T, Ngai J, Stowers L. Learned recognition of maternal signature odors mediates the first suckling episode in mice. *Curr Biol.* 2012 Nov 6;22(21):1998-2007

Mendez-Gallardo V, Robinson S.R. Odor-induced crawling locomotion in the newborn rat: effects of amniotic fluid and milk. *Dev Psychobiol* 56: 327-339, 2014.

Matsukawa M, Imada M, Aizawaa S, Satob T. Habitat odor can alleviate innate stress responses in mice. Elsevier, Brain research 1631 (2016) 46–52.

Nicolaïdis S. Prenatal imprinting of postnatal specific appetites and feeding behavior. Metabolism. 2008 Oct;57 Supp2:S22-6

Nishi M, Horii-Hayashi N, Sasagawa T. Effects of early life adverse experiences on the brain: implications from maternal separation models in rodents. Front Neurosci. 2014 Jun 17;8:166. doi: 10.3389/fnins.2014.00166

Oostindjer M, Bolhuis JE, Simon K, van den Brand H, Kemp B. Perinatal flavour learning and adaptation to being weaned: all the pig needs is smell. PLoS One. 2011;6(10):e25318.

Palouzier-Paulignan B, Lacroix MC, Aimé P, Baly C, Caillol M, Congar P, Julliard AK, Tucker K, Fadool DA. Olfaction under metabolic influences. Chem Senses. 2012 Nov;37(9):769-97. doi: 10.1093/chemse/bjs059.

Todrank J, Heth G, Restrepo D. Effects of in utero odorant exposure on neuroanatomical development of the olfactory bulb and odour preferences. Proc Biol Sci. 2011 Jul 7;278(1714):1949-55

Treloar HB, Feinstein P, Mombaerts P, Greer CA. Specificity of glomerular targeting by olfactory sensory axons. J Neurosci. 2002 Apr 1;22(7):2469-77

Valle-Leija P, Blanco-Hernández E, Drucker-Colín R, Gutiérrez-Ospina G, Vidaltamayo R. Supernumerary formation of olfactory glomeruli induced by chronic odorant exposure: a constructivist expression of neural plasticity. PLoS One. 2012;7(4):e35358. doi: 10.1371/journal.pone.0035358.

Ventura AK, Worobey J. Early influences on the development of food preferences. Curr Biol. 2013 May 6;23(9):R401-8

Zou DJ, Chesler A, Firestein S. How the olfactory bulb got its glomeruli: a just so story? Nat Rev Neurosci. 2009 Aug;10(8):611-8. doi: 10.1038/nrn2666.

Annexes

		Chronogramme											
		ANNEE 1				ANNEE 2				ANNEE 3			
Livrables / Jalons	Partenaires	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10	T11	T12
TACHE1: Mise en place et validation du modèle chez la SOURIS	NBO												
D2.1 Expérience pilote GC-MS OCTANAL G20-PN10	NBO+SC	X											
D2.2 Expérience pilote GC-MS CUMIN G20-PN10	NBO+SC					X							
M1 - Choix conditions d'odorisation: concentration/mode d'administration		X				X							
Prélèvements fluides GC/MS, tests comportements													
TASK 2: Effets sur les performances des SOURIS	NBO												
D3.1 Paramètres métaboliques	NBO		X	X	X		X	X	X				
D3.3 Préférences et choix alimentaires	NBO		X	X	X		X	X	X				
D3.2 Niveau de stress	NBO		X	X	X		X	X	X				
D3.3 Effet sur la réponse cérébrale (c-fos)					X				X				
M2 - Olfaction et performances des SOURIS						X				X			
Choix alimentaires; étude de stress													
TASK 3: Mécanismes cellulaires de l'empreinte olfactive dans la MO	NBO, BDR												
D3.1 Sensibilité olfactive en EOG et culture primaire	NBO		X				X						
D3.2 Analyses moléculaires (qPCR, HIS, FACS)	NBO+SC			X				X					
Deep imaging, WB)													
D3.3 Survie-activité-dépendante BrdU	NBO				X								
D3.4 Profils de méthylation	BDR				X				X				
M3 - Mécanismes de plasticité dans la MO													
Electrophysiologie, Imagerie, BioMol, pyroséquençage													
TASK 4: Mécanismes cellulaires de l'empreinte olfactive dans le BO	NBO, IMNC												
D4.1 Cartographie et réponse glomérulaire	NBO		X	X	X		X	X	X				
D4.2 Plasticité synaptique	NBO		X	X	X		X	X	X				
D4.3. Analyse moléculaire et biochimique	NBO		X	X	X		X	X	X				
M4: Mécanismes de plasticité dans le BO						X				X			
Electrophysiologie, Biochimie et Neuroanatomie													
TACHE 5: Impact odorisation in utero CUMIN sur l'adaptation à l'allaitement artificiel chez l'ovine	PRC												
D5.1 Expérience pilote				X									
D5.2 Effet sur les préférences alimentaires								X					
D5.3 Effet sur la réponse cérébrale										X			
M5: Mise en place d'un protocole d'allaitement artificiel facilité chez l'agneau													
TASK0: Project coordination	Tous		X		X		X		X		X		X

Figure 2 : Chronogramme du projet pépinière

	forward	reverse	fragment (bp)
18S	TGGAATTACCGCGGCTGCTG	GGACTCTTTTCGAGGCCCTGTA	101
Suclg	GCGTCATCAACCCTGGAGAA	CTGCCCAATCCGACTTG	140
olfr2 (mi7)	TCCTGATATCTAGCTCATCGAACA	CACTCTCCCAGTGTGGTTCC	166
olfr56	GCGCTCTGTGGAAATGTCCT	GTCCTAACAAGAGACCCTCTGA	238
btub	TGAGGCCTCCTCTCACAAGT	GGCCTGAATAGGTGTCCAAA	105

Tableau 1 : Tableau des amorces pour la qPCR

	19-avr		02-mai		03-mai			
	Moyenne	Ecart Type	Moyenne	Ecart Type	Moyenne	Ecart Type		
NO-NO	16,80	9,31	NO-NO	28,25	7,41	NO-NO	20,00	10,88
NO-ODO	13,25	5,19	NO-ODO	24,33	5,13	NO-ODO	27,00	5,85
ODO-NO	14,80	12,93	ODO-NO	19,33	10,26	ODO-NO	25,00	4,58
ODO-ODO	13,25	16,19	ODO-ODO	22,00	3,46	ODO-ODO	23,33	4,93

Tableau 2 : Moyenne et écart type du nombre de fèces des trois OPF

Abstract

Many data show that the olfactory environment of the animal can affect the plasticity of its olfactory system, from the mucosa to the first information relay, the olfactory bulb.

During my training, I have been involved in a project aiming at assessing the impact of the odorant enrichment of the perinatal environment on the olfactory system plasticity and on the associated behaviors on CD1 mice. For that purpose, young mice have been submitted to an odor (heptanal) during the perinatal period through mother's food. Behavior studies have been conducted, particularly concerning the olfactory preference and the response to stress of being separated from the mother at different developmental stages in relation to the mother's status. A molecular study was also conducted. I show that the animals are less stressed by the maternal separation when they are tested in their known perinatal olfactory environment at weaning, even if they don't show any odor-induced locomotion when they are younger. As no variation of the quantity of transcripts of the olfactory receptor sensitive to heptanal in the olfactory mucosa is observed between odorized and non-odorized pups, we can conclude that the behavioral differences cannot be attributed to a variation of the quantity of transcripts of this receptor.

Key words : Open field, Heptanal, perinatal odorisation, olfactory receptor, CD1