



**HAL**  
open science

# Incidences comportementales et physiologiques d'une obstruction nasale bilatérale chez le rat en développement

Mathieu Gelhaye

► **To cite this version:**

Mathieu Gelhaye. Incidences comportementales et physiologiques d'une obstruction nasale bilatérale chez le rat en développement. Neurosciences [q-bio.NC]. Université Henri Poincaré - Nancy 1, 2007. Français. NNT : 2007NAN10078 . tel-01748259

**HAL Id: tel-01748259**

**<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01748259>**

Submitted on 29 Mar 2018

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

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



## AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : [ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr](mailto:ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr)

## LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

[http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg\\_droi.php](http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php)

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

FACULTE DES SCIENCES ET TECHNIQUES  
U.F.R. Sciences et Techniques Biologiques  
Ecole Doctorale Biologie Santé Environnement

UMR 7178 CNRS, IPHC, DEPE, Physiologie du Comportement

## THÈSE

présentée pour l'obtention du titre de  
Docteur de l'Université Henri Poincaré, Nancy 1  
Spécialité neurosciences

Soutenue publiquement le 07 novembre 2007 par

**Mr Mathieu GELHAYE**

# Incidences Comportementales et Physiologiques d'une Obstruction Nasale Bilatérale chez le Rat en Développement



### Membres du jury

#### **Président :**

Mr. Simon THORNTON

Professeur UHP - INSERM U 684

#### **Rapporteurs :**

Mme Claudine VERSAUX-BOTTERI

Professeur UFC EA 481 / INSERM U 872

Mr. Benoist SCHAAL

Directeur de recherche CNRS UPR 5170

#### **Examineurs :**

Mme Christine LEGRAND-FROSSI

Maître de conférences UHP - CNRS UMR 7178

Mme Marie TRABALON (directrice de thèse)

Professeur UHP - CNRS UMR 7178

*À tous ceux qui m'ont soutenu dans la réalisation de ce projet...*

# Remerciements

Je tiens à remercier les membres du jury d'avoir accepté d'évaluer ce travail et d'y avoir apporté leur regard critique. Leurs nombreuses propositions constituent autant de pistes de réflexions qui seront, je n'en doute pas, explorées dans les années futures. Merci à **Mr. Simon Thornton**, qui a accepté de présider ce jury malgré une thématique qui semblait *a priori* relativement éloignée de la sienne. Merci également aux rapporteurs de cette thèse, **Mme. Claudine Versaux-Botteri** et **Mr. Benoist Schaal**, pour leur rapidité et l'intérêt qu'ils ont porté à ce travail. Leurs remarques et leurs suggestions ont permis d'améliorer la qualité de ce manuscrit.

*Merci de m'avoir fait l'honneur de participer à cette commission d'examen.*

Merci au Département Ecologie, Physiologie et Ethologie de l'Institut Pluridisciplinaire Hubert Curien pour avoir apporté le soutien matériel, logistique et financier nécessaire à la réalisation de ce travail. La qualité des données présentées ici est le fruit d'un travail d'équipe, je remercie donc tous les membres - temporaires ou permanents - de l'équipe Physiologie du Comportement. Je tiens en premier lieu à remercier **Marie Trabalon** qui a dirigé cette thèse dans la continuité de mon travail de DEA. Je la remercie vivement pour m'avoir accueilli dans son équipe, pour sa confiance, son énergie, sa disponibilité et pour son aide dans la partie comportementale. Merci également à **Christine Legrand-Frossi** pour le temps qu'elle m'a consacré et pour ses nombreux et précieux conseils dans la partie immunologique. Je tiens également à exprimer ma reconnaissance à **Jean-Marc Martrette** pour son expérience et son savoir-faire sans lesquels l'étude des muscles oro-faciaux n'aurait pas été possible.

*Merci à vous trois pour votre encadrement et pour la relecture de ce mémoire.*

Merci **aux étudiants et au personnel technique** de l'équipe pour leur aide, leur soutien et leur présence source d'une constante bonne humeur : Christelle Robert, Aude Erbrech, Joëlle Couturier, Christiane Tankosic, Caroline Suter, Christian Vogel (à qui je souhaite une longue et agréable retraite), Jean-Charles Olry...

Je tiens finalement à exprimer ma reconnaissance à Mr Girardet du Laboratoire des Biosciences de l'Aliment (UC885-INRA/LBSA) pour le prêt du matériel nécessaire à l'analyse des électrophorèses et au personnel technique du service de radio-immunologie du CHU de Brabois pour le dosage des hormones thyroïdiennes.

*Merci à vous tous sans qui ce travail n'aurait jamais vu le jour.*

# Résumé

## **Incidences Comportementales et Physiologiques d'une Obstruction Nasale Bilatérale chez le Rat en Développement**

Ce mémoire de thèse s'intègre dans un programme de recherche sur les conséquences d'une obstruction nasale (ON) bilatérale chez le mammifère en développement. Afin de savoir si l'ON pouvait perturber le comportement exploratoire nécessaire à la dispersion des jeunes et provoquer un stress qui perturberait le développement de l'individu, une ON a été induite chez des rats de 8 jours (J8). Ses conséquences ont été examinées 24h après le traitement (J9), à la fin de la période d'obstruction (J15) et six jours après la réouverture des narines (J21). Nos résultats montrent que l'ON perturbe effectivement le comportement exploratoire des individus. Ainsi, l'orientation par rapport aux odeurs familières, les réactions face à la nouveauté et les performances dans une tâche d'apprentissage spatial sont altérées. L'ON diminue en outre la prise alimentaire et la croissance des individus. Les jeunes ON développent par ailleurs une respiration buccale chronique associée à une adaptation structurale des muscles oro-faciaux. Au niveau endocrinien, l'ON entraîne une hyper-corticostéronémie et un hypothyroïdisme. Ces modifications hormonales sont globalement plus marquées chez les femelles. Au niveau du système immunitaire, l'ON provoque une atrophie de la rate et du thymus à J15. L'atrophie du thymus se maintient jusqu'à J21 chez les femelles qui présentent, à cet âge, une diminution de la réponse proliférative des thymocytes. Pour le rat, l'obstruction nasale constitue donc une situation stressante multifactorielle. Ses conséquences sont plus marquées chez les femelles et pourraient éventuellement perdurer jusqu'à l'âge adulte.

**Mots-clés :** Obstruction Nasale, Développement Postnatal, Privation Olfactive, Stress, Comportement Exploratoire, Muscles Oro-Faciaux, Chaînes Lourdes de Myosine, Organes Lymphoïdes, Réponse Proliférative des Lymphocytes.

# Abstract

## **Behavioural and Physiological Consequences of Bilateral Nasal Obstruction on Growing Rats**

This work is part of a research program dealing with the consequences of bilateral nasal obstruction (NO) during the postnatal development of mammals. Its aim was to test whether NO could alter the exploratory behaviour and induce a stress response, which could perturb the development of the individual. Therefore, a NO was induced in 8-day old rats (D8) and its effects were investigated 24h after the treatment (D9), at the end of the obstruction period (D15) and six days after the reopening of the nostrils (D21). The results showed that NO deteriorated the exploratory behaviour. The orientating abilities, the novelty-seeking behaviour and the performances in a spatial learning task were indeed altered. Besides, a decreased food intake associated with a growth deceleration was observed in NO animals. These disturbances were abrogated, even reversed, with the reopening of the nostrils. The modifications of respiratory behaviour generated an adaptative response of oro-facial muscles which presented, at D21, a profile in myosin heavy chains adapted to chronic oral breathing. In addition, NO involved a hypercorticosteronemy and a hypothyroidism at D9, D15 and D21. These hormonal modifications were more pronounced in females. Lastly, NO was associated with an atrophy of the spleen and the thymus at D15. The thymic atrophy was maintained until D21 in females, which showed, at this age, a decrease of thymocyte proliferative response. In rats, nasal obstruction can thus be considered like a multifactorial stressful situation. Its impacts are more pronounced in females and could persist at the adulthood.

**Keywords:** Nasal Obstruction, Postnatal Development, Olfactory Deprivation, Stress, Exploratory Behaviour, Orofacial Muscles, Myosin Heavy Chains, Lymphoid Organs, Lymphocyte Proliferative Response.

# Sommaire



# Sommaire

<b>Liste des figures</b> .....	p. 11
<b>Liste des tableaux</b> .....	p. 15
<b>Liste des abréviations</b> .....	p. 16
<b>Liste des publications</b> .....	p. 17

## Chapitre 1

<b>Introduction générale</b> .....	p. 18
<b>1.1 Obstruction nasale et troubles respiratoires</b> .....	p. 21
1.1.1 <u>La ventilation nasale</u>	
1.1.2 <u>Obstruction nasale et homéostasie gazeuse du sang</u>	
1.1.3 <u>Obstruction nasale et activité des muscles oro-faciaux</u>	
<b>1.2 Obstruction nasale et troubles olfactifs</b> .....	p. 23
1.2.2 <u>Obstruction nasale et développement du système olfactif</u>	
1.2.3 <u>Privation olfactive et comportements précoces</u>	
<b>1.3 Obstruction nasale et réponse au stress</b> .....	p. 26
1.3.1 <u>La réponse au stress chronique</u>	
1.3.2 <u>Fonctions des glucocorticoïdes</u>	
1.3.3 <u>Impacts sur le système immunitaire</u>	
<b>1.4 Objectifs du travail expérimental</b> .....	p. 30

## Chapitre 2

### Modèle expérimental et méthodes générales p. 32

#### 2.1 Modèle animal..... p. 33

#### 2.2 Élevage..... p. 34

#### 2.3 Anesthésie..... p. 34

#### 2.4 Constitution des lots expérimentaux..... p. 35

#### 2.5 Prélèvement des extraits biologiques..... p. 35

#### 2.6 Étude histologique..... p. 36

#### 2.7 Analyse statistique..... p. 36

## Chapitre 3

### Obstruction nasale et validation de la procédure..... p. 37

#### 3.1 Introduction..... p. 38

#### 3.2 Matériel et méthodes expérimentales..... p. 39

##### 3.2.1 Suivi des portées

##### 3.2.2 Bulbes olfactifs

##### 3.2.3 Comportement maternel

##### 3.2.4 Analyses statistiques

#### 3.3 Résultats..... p. 42

##### 3.3.1 Obstruction nasale et réouverture des narines

##### 3.3.2 Obstruction nasale et développement des bulbes olfactifs

##### 3.3.3 Obstruction nasale et taux de mortalité

##### 3.3.4 Obstruction nasale et comportement maternel

#### 3.4 Discussion..... p. 44

<b>Chapitre 4</b>	
<b>Obstruction nasale et comportement exploratoire.....</b>	<b>p. 48</b>
<b>4.1 Introduction.....</b>	<b>p. 49</b>
<b>4.2 Matériel et méthodes expérimentales.....</b>	<b>p. 51</b>
4.2.1 <u>Orientation par rapport à l'environnement olfactif familial</u>	
4.2.2 <u>Réactions vis-à-vis de la nouveauté</u>	
4.2.3 <u>Apprentissage et mémoire spatiale</u>	
4.2.4 <u>Analyses statistiques</u>	
<b>4.3 Résultats.....</b>	<b>p. 54</b>
4.3.1 <u>Obstruction nasale et comportement exploratoire d'orientation</u>	
4.3.1.1 Test "Sciure propre x sciure propre"	
4.3.1.2 Test "Sciure nid x sciure propre"	
4.3.2 <u>Obstruction nasale et comportement exploratoire d'investigation</u>	
4.3.2.1 Face à un nouvel objet	
4.3.2.2 Face à un nouvel environnement	
4.3.3 <u>Obstruction nasale, apprentissage et mémoire spatiale</u>	
4.3.3.1 Apprentissage spatial	
4.3.3.2 Mémoire spatiale	
<b>4.4 Discussion.....</b>	<b>p. 59</b>

<b>Chapitre 5</b>	
<b>Conséquences physiologiques de l'obstruction nasale.....</b>	<b>p. 63</b>
<b>5.1 Obstruction nasale, respiration buccale et muscles oro-faciaux</b>	<b>p. 64</b>
5.1.1 <u>Introduction</u>	
5.1.2 <u>Matériel et méthodes expérimentales</u>	
5.1.2.1 Rythme d'ouverture de la bouche	
5.1.2.2 Prélèvements musculaires	
5.1.2.3 Extraction et dosage de la myosine	
5.1.2.4 Analyse des chaînes lourdes de myosine	
5.1.2.5 Analyses statistiques	

5.1.3	<u>Résultats</u>	
5.1.3.1	Obstruction nasale et rythme d'ouverture de la bouche	
5.1.3.2	Obstruction nasale et développement des muscles orofaciaux	
5.1.4	<u>Résumé</u>	
<b>5.2</b>	<b>Obstruction nasale, prise alimentaire et croissance.....</b>	<b>p. 72</b>
5.2.1	<u>Introduction</u>	
5.2.2	<u>Matériel et méthodes expérimentales</u>	
5.2.2.1	Prise alimentaire	
5.2.2.2	Bol alimentaire	
5.2.2.3	Paramètres de la croissance	
5.2.2.4	Analyses statistiques	
5.2.3	<u>Résultats</u>	
5.2.3.1	Obstruction nasale et prise alimentaire	
5.2.3.2	Obstruction nasale et croissance	
5.2.4	<u>Résumé</u>	
<b>5.3</b>	<b>Obstruction nasale, corticostérone et hormones thyroïdiennes</b>	<b>p. 77</b>
5.3.1	<u>Introduction</u>	
5.3.2	<u>Matériel et méthodes expérimentales</u>	
5.3.2.1	Glandes surrénales	
5.3.2.2	Dosages hormonaux	
5.3.2.3	Analyses statistiques	
5.3.3	<u>Résultats</u>	
5.3.3.1	Glandes surrénales et corticostérone	
5.3.3.2	Hormones thyroïdiennes	
5.3.4	<u>Résumé</u>	
<b>5.4</b>	<b>Obstruction nasale, organes lymphoïdes et réponse proliférative</b>	<b>p. 83</b>
5.4.1	<u>Introduction</u>	
5.4.2	<u>Matériel et méthodes expérimentales</u>	
5.4.2.1	Etude histologique du thymus	
5.4.2.2	Tests de prolifération cellulaire	
5.4.2.3	Analyses statistiques	
5.4.3	<u>Résultats</u>	
5.4.3.1	Impacts sur le thymus	
5.4.3.2	Impacts sur la rate	
5.4.4	<u>Résumé</u>	

<b>5.5 Discussion</b> .....	p. 89
5.5.1 <u>Obstruction nasale, respiration buccale et muscles orofaciaux</u>	
5.5.2 <u>Obstruction nasale, prise alimentaire et croissance</u>	
5.5.3 <u>Obstruction nasale, corticostérone et hormones thyroïdiennes</u>	
5.5.4 <u>Obstruction nasale, organes lymphoïdes et réponse proliférative</u>	

## Chapitre 6

Conclusion et perspectives.....	p. 103
---------------------------------	--------

Références bibliographiques.....	p. 107
----------------------------------	--------

Annexes.....	p. 133
--------------	--------

<b>Annexe 1 : Gelhaye, M., Martrette, J.M., Legrand-Frossi, C., Trabalon, M., 2006.</b> Myosin heavy chain expression and muscle adaptation in rat. <i>Resp. Physiol. Neurobiol.</i> 154(3): 443-452.....	p. 134
---	--------

<b>Annexe 2 : Gelhaye, M., Trabalon, M., Martrette, J.M., Legrand-Frossi, C., 2006.</b> Effect of early olfactory deprivation on novelty seeking behavior and primary and secondary lymphoid organs in young rats. <i>Psychoneuroendocrinol.</i> 31(8): 997-1008.....	p. 145
---	--------

<b>Annexe 3 : Gelhaye, M., Trabalon, M., Martrette, J.M., Mayer, J.C., Legrand-Frossi, C.</b> Maternal behavior and offspring's development under early nasal obstruction in rats. <i>Physiol. Behav.</i> (soumis).....	p. 168
---	--------

## Liste des figures

<b>Figure 1.</b> Structures et comportements susceptibles d'être touchées par l'obstruction nasale.....	p. 20
<b>Figure 2.</b> Voies d'entrée des stimuli chimiques dans les cavités nasales.....	p. 24
<b>Figure 3.</b> Structure histologique des glandes surrénales chez les mammifères.	p. 27
<b>Figure 4.</b> Hypothèses à la base du travail expérimental.....	p. 30
<b>Figure 5.</b> Évolution des relations mère - jeunes et développement neuro-sensoriel du rat au cours de la période postnatale.....	p. 33
<b>Figure 6.</b> Lots obstruction nasale, contrôle et témoin à 9, 15 et 21 jours.....	p. 35
<b>Figure 7.</b> (A) Schéma récapitulatif des différentes étapes du protocole mis en œuvre dans le cadre de l'étude histologique. (B) Composition de la solution de Bouin-Hollande.....	p. 36
<b>Figure 8.</b> Prévalence des méthodes utilisées pour effectuer une obstruction nasale expérimentale sur des animaux de laboratoire.....	p. 38
<b>Figure 9.</b> Principales activités maternelles chez le rat.....	p. 38
<b>Figure 10.</b> Dispositif expérimental utilisé pour tester le comportement maternel.....	p. 40
<b>Figure 11.</b> Taux cumulé de réouverture des narines chez les animaux exposés à l'obstruction nasale.....	p. 42
<b>Figure 12.</b> Masse spécifique des bulbes olfactifs à 9, 15 et 21 jours chez les animaux témoins, contrôles et obstruction nasale.....	p. 42
<b>Figure 13.</b> Exemple de coloration d'un bulbe olfactif au violet de crésyl chez une femelle contrôle de 21 jours.....	p. 43
<b>Figure 14.</b> Taux de mortalité cumulé chez les animaux exposés à l'obstruction nasale.....	p. 44

<b>Figure 15.</b> Comportement maternel dans les portées témoins, contrôles et obstruction nasale de 9 jours.....	p. 44
<b>Figure 16.</b> Dispositifs expérimentaux utilisés pour tester l'orientation vis-à-vis de l'environnement familial.....	p. 51
<b>Figure 17.</b> Dispositif expérimental utilisé pour tester les réactions des animaux face à la nouveauté.....	p. 53
<b>Figure 18.</b> Labyrinthe en épi utilisé pour tester l'apprentissage et la mémoire spatiale.....	p. 53
<b>Figure 19.</b> Impacts de l'obstruction nasale précoce sur le comportement des animaux soumis au test "sciure propre x sciure propre".....	p. 54
<b>Figure 20.</b> Distribution du temps passé dans chaque branche du labyrinthe dans le cadre du test "sciure propre x sciure propre" à 9, 15 et 21 jours.....	p. 55
<b>Figure 21.</b> Impacts de l'obstruction nasale précoce sur le comportement des animaux soumis au test "sciure nid x sciure propre".....	p. 55
<b>Figure 22.</b> Distribution du temps passé dans chaque branche du labyrinthe dans le cadre du test "sciure nid x sciure propre" à 9, 15 et 21 jours chez les animaux témoins, contrôles et obstruction nasale.....	p. 56
<b>Figure 23.</b> Réactions vis-à-vis de la nouveauté chez des animaux témoins, contrôles et obstruction nasale de 21 jours.....	p. 57
<b>Figure 24.</b> Apprentissage spatial de 14 à 18 jours chez les animaux témoins, contrôles et obstruction nasale.....	p. 58
<b>Figure 25.</b> Mémoire spatiale chez les animaux témoins, contrôles et obstruction nasale de 21 jours.....	p. 59
<b>Figure 26.</b> Illustration schématique des niveaux d'organisation du muscle strié squelettique.....	p. 64
<b>Figure 27.</b> Muscles oro-faciaux prélevés lors des dissections.....	p. 67
<b>Figure 28.</b> Rythme d'ouverture de la bouche chez les individus exposés à l'obstruction nasale.....	p. 69

<b>Figure 29.</b> Masses spécifiques du diaphragme, du digastrique antérieur, du masséter superficiel et du <i>levator nasolabialis</i> à 21 jours chez les animaux témoins, contrôles et obstruction nasale.....	p. 70
<b>Figure 30.</b> Exemples de gels d'électrophorèse obtenus à partir d'extraits musculaires d'individus femelles issus des groupes contrôle et obstruction nasale.....	p. 70
<b>Figure 31.</b> Composition relative en chaînes lourdes de myosine du diaphragme, du digastrique antérieur, du masséter superficiel et du <i>levator nasolabialis</i> à 21 jours chez les individus témoins, contrôles et obstruction nasale.....	p. 71
<b>Figure 32.</b> Postures d'allaitement prises en compte lors de l'évaluation du comportement alimentaire.....	p. 73
<b>Figure 33.</b> Mesures morphométriques effectuées sur les animaux expérimentaux à J9, J12, J15, J18 et J21.....	p. 74
<b>Figure 34.</b> Comportement alimentaire à 9, 15 et 21 jours chez les animaux témoins, contrôles et obstruction nasale.....	p. 74
<b>Figure 35.</b> (A) Taux maximal d'attachement aux mamelles à 9, 15 et 21 jours chez les individus témoins, contrôles et obstruction nasale. (B) Corrélation entre le nombre simultané de jeunes à la mamelle et la durée de l'évènement alimentaire chez les animaux exposés à l'obstruction nasale de 9 jours.....	p. 75
<b>Figure 36.</b> Masse spécifique du bol alimentaire à 9, 15 et 21 jours chez les animaux témoins, contrôles et obstruction nasale.....	p. 75
<b>Figure 37.</b> Croissance pondérale (A) et gain pondéral (B) des animaux témoins, contrôles et obstruction nasale entre le 9 <sup>ème</sup> et le 21 <sup>ème</sup> jour postnatal.....	p. 76
<b>Figure 38.</b> Croissance longitudinale (A) et gain longitudinal (B) des individus témoins, contrôles et obstruction nasale entre le 9 <sup>ème</sup> et le 21 <sup>ème</sup> jour postnatal.....	p. 77
<b>Figure 39.</b> Principe des dosages immunologiques par compétition.....	p. 79

<b>Figure 40.</b> Masse spécifique des glandes surrénales à 9, 15 et 21 jours chez les animaux témoins, contrôles et obstruction nasale.....	p. 80
<b>Figure 41.</b> Exemple de coloration des glandes surrénales par la méthode hématoxyline - éosine chez une femelle contrôle de 21 jours.....	p. 81
<b>Figure 42.</b> Concentration plasmatique en corticostérone à 9, 15 et 21 jours chez les animaux témoins, contrôles et obstruction nasale.....	p. 81
<b>Figure 43.</b> Concentration plasmatique en thyroxine à 9, 15 et 21 jours chez les animaux témoins, contrôles et obstruction nasale.....	p. 82
<b>Figure 44.</b> Concentration plasmatique en triiodothyronine à 9, 15 et 21 jours chez les animaux témoins, contrôles et obstruction nasale.....	p. 82
<b>Figure 45.</b> Masse spécifique du thymus à 9, 15 et 21 jours chez les animaux témoins, contrôles et obstruction nasale.....	p. 86
<b>Figure 46.</b> Exemple de coloration des thymus par la méthode de Mann-Dominici chez une femelle contrôle de 21 jours.....	p. 87
<b>Figure 47.</b> Nombre total de thymocytes (A) et réponse proliférative des thymocytes à la ConA et à la PHA (B) chez les animaux témoins, contrôles et obstruction nasale de 21 jours.....	p. 87
<b>Figure 48.</b> Masse spécifique de la rate à 9, 15 et 21 jours chez les animaux témoins, contrôles et obstruction nasale.....	p. 88
<b>Figure 49.</b> Nombre total de splénocytes (A) et réponse proliférative des splénocytes à la ConA et à la PHA (B) chez les animaux témoins, contrôles et obstruction nasale de 21 jours.....	p. 89
<b>Figure 50.</b> Illustration schématique des principales voies par lesquelles les variations de conditions environnementales sont susceptibles d'influencer la répartition en isoformes de chaînes lourdes de myosine des muscles squelettiques.....	p. 90
<b>Figure 51.</b> Schéma récapitulatif des conséquences physiologiques et comportementales de l'obstruction nasale précoce : relations hypothétiques entre les différents facteurs.....	p.106

## Liste des tableaux

<b>Tableau 1.</b> Effets spécifiques de la respiration buccale forcée ou volontaire sur l'activité électromyographique des muscles ventilatoires.....	p. 22
<b>Tableau 2.</b> Principales adaptations cognitives, comportementales et physiologiques au cours de la réponse neuroendocrine au stress chez les vertébrés.....	p. 26
<b>Tableau 3.</b> Tableau récapitulatif des variables impliquées dans les traitements expérimentaux.....	p. 35
<b>Tableau 4.</b> Surface relative des différentes couches du bulbe olfactif chez les animaux témoins, contrôles et obstruction nasale de 21 jours.....	p. 43
<b>Tableau 5.</b> Qualité des interactions lors des tests de réactions face à un nouvel objet chez les animaux témoins, contrôles et obstruction nasale de 21 jours.....	p. 57
<b>Tableau 6.</b> Principaux types d'isoformes de chaînes lourdes de myosine identifiés dans les muscles striés des mammifères.....	p. 65
<b>Tableau 7.</b> Propriétés structurales, métaboliques et contractiles des différents types de fibres musculaires.....	p. 65
<b>Tableau 8.</b> Composition des tampons de lavage des muscles et d'extraction de la myosine.....	p. 68
<b>Tableau 9.</b> Composition des gels d'électrophorèse.....	p. 68
<b>Tableau 10.</b> Composition des tampons d'électrophorèse.....	p. 69
<b>Tableau 11.</b> Composition des solutions de coloration et de décoloration des gels d'électrophorèse.....	p. 69
<b>Tableau 12.</b> Taille relative des corticosurrénales chez les animaux témoins, contrôles et obstruction nasale de 21 jours.....	p. 81
<b>Tableau 13.</b> Surface relative (%) de la zone médullaire thymique chez les animaux témoins, contrôles et obstruction nasale de 21 jours.....	p. 87

## Liste des abréviations

<b>C</b>	Groupe contrôle
<b>ON</b>	Groupe obstruction nasale
<b>T</b>	Groupe témoin
<b>J8, J9...</b>	Jour postnatal 8, 9...
<b>SNC</b>	Système nerveux central
<b>CORT</b>	Corticostérone
<b>ACTH</b>	Homone adrénocorticotrope
<b>CRH</b>	Corticolibérine
<b>T3</b>	Triiodothyronine
<b>T4</b>	Thyroxine
<b>MHC</b>	Chaînes lourdes de myosine
<b>DA</b>	Digastrique antérieur
<b>Dia</b>	Diaphragme
<b>LN</b>	<i>Levator nasolabialis</i>
<b>MS</b>	Masséter superficiel
<b>IP</b>	Indice de prolifération

# Liste des publications

## Articles internationaux avec comité de lecture

- Article 1. Gelhaye, M., Trabalon, M., Martrette, J.M., Legrand-Frossi, C., 2006.**  
Effects of early olfactory deprivation on novelty seeking behavior and primary and secondary lymphoid organs in young rats. *Psychoneuroendocrinol.* 31(8): 997-1008.
- Article 2. Gelhaye, M., Martrette, J.M., Legrand-Frossi, C., Trabalon, M., 2006.**  
Myosin heavy chain expression and muscle adaptation in rat. *Resp. Physiol. Neurobiol.* 154(3): 443-452.
- Article 3. Gelhaye, M., Trabalon, M., Martrette, J.M., Mayer, J.C., Legrand-Frossi, C.**  
Relations between maternal behavior and offspring's development under early nasal obstruction in rats. *Physiol. Behav.* (soumis).

## Communication affichée

**Gelhaye, M., Martrette, J.M., Legrand-Frossi, C., Cousin, X., Trabalon, M., 2004.**  
Modifications comportementales et biologiques suite à un stress olfactif chez *Rattus norvegicus*. *Comportement, cognition et adaptation (colloque SFECA, Caen)*.  
Communication écrite.

# 1

## Introduction générale



# 1 Introduction générale

Tout au long de leur existence, les organismes vivants doivent maintenir leur milieu interne dans un état de stabilité relative en dépit des variations de conditions environnementales. Cette notion d'équilibre physiologique, encore appelé "homéostasie", fut établie au cours de la deuxième moitié du 19<sup>ème</sup> siècle par Claude Bernard puis développée au début du 20<sup>ème</sup> siècle par Walter Cannon. Chez les animaux, le maintien de cet équilibre de fonctionnement passe par des modifications de comportement et par la mise en place de mécanismes neuroendocriniens permettant d'ajuster la structure et le fonctionnement des systèmes physiologiques périphériques. Au cours de la période de développement, le mammifère est particulièrement sensible aux variations de conditions environnementales. Du fait d'un répertoire comportemental limité et de l'immaturation de certains processus physiologiques, le nouveau-né est fortement dépendant des soins maternels pour réguler son homéostasie.

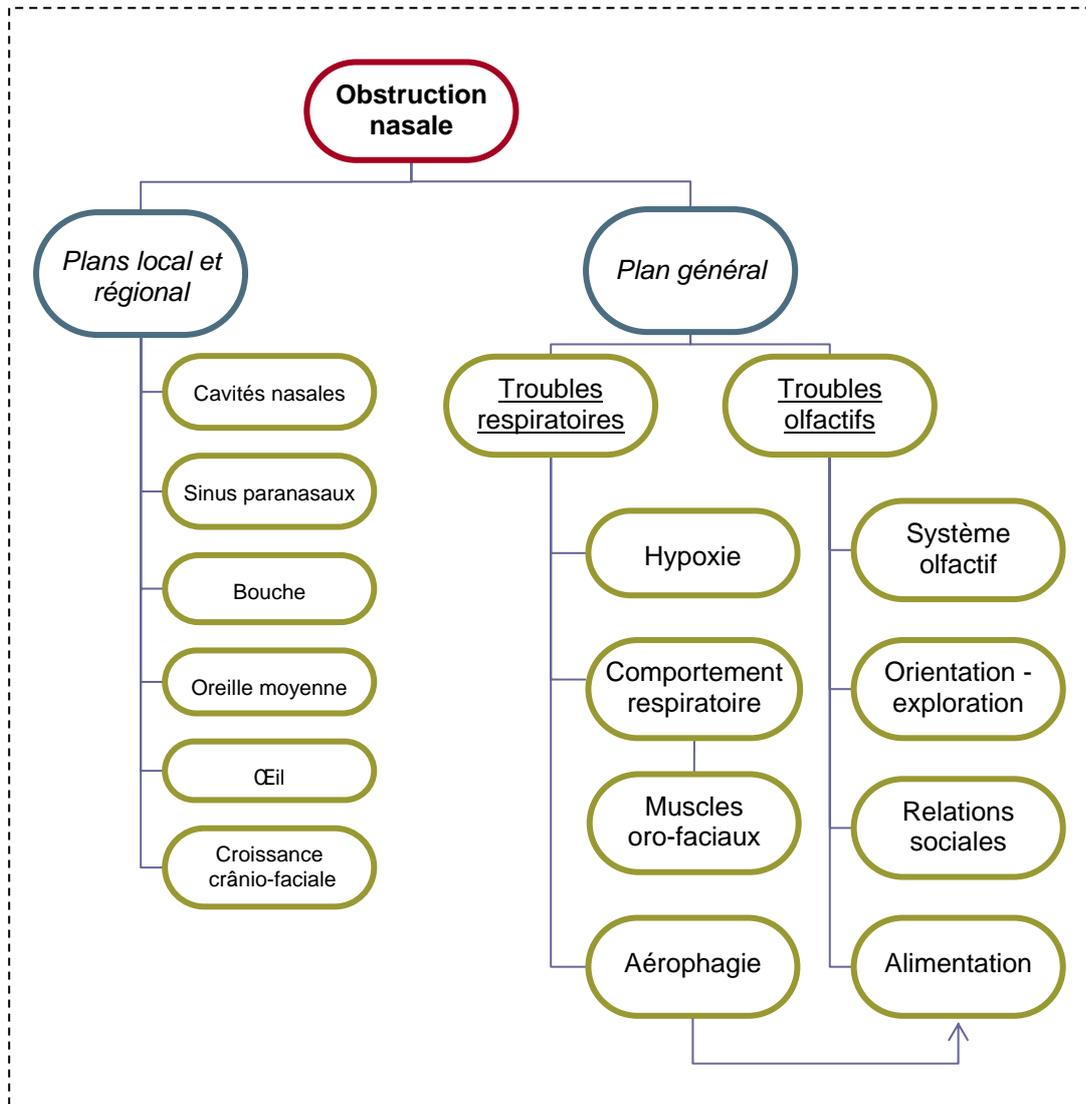
Les signaux sensoriels jouent un rôle de premier plan dans la mise en place et le maintien de la relation bidirectionnelle liant la mère à sa progéniture. Du point de vue du jeune, l'olfaction est essentielle à la reconnaissance de la mère et des mamelles (Blass et Teicher, 1980), du nid (Brown, 1982), des partenaires apparentés ou familiaux (Kristensen *et al.*, 2001). Par conséquent, on peut supposer que la privation olfactive au cours de la période postnatale est susceptible de perturber l'expression des comportements précoces et subséquemment l'homéostasie du jeune mammifère. Diverses techniques ont été employées afin d'étudier les effets de la privation olfactive sur l'homéostasie du mammifère en développement : bulbectomie olfactive, anosmie chimique... Ces procédures restent éloignées des conditions pathologiques rencontrées dans la nature où la privation olfactive est classiquement associée à une simple obstruction des cavités nasales (Seiden et Duncan, 2001). Ses étiologies sont variées : elle peut être d'origine congénitale, tumorale, inflammatoire ou traumatique (Raji *et al.*, 2001).

L'obstruction nasale entraîne une perturbation du flux aérien transitant par les fosses nasales. Elle est généralement due à une diminution du calibre de la filière nasale d'origine mécanique ou fonctionnelle. Bien que l'obstruction nasale totale soit un phénomène rare, la perturbation de l'écoulement de l'air dans les fosses nasales est un problème rencontré fréquemment et son retentissement est habituellement sous-estimé (Vig, 1998). Lorsque les cavités nasales sont obstruées, le système nerveux central envoie aux structures effectrices périphériques des ordres moteurs pour libérer une voie respiratoire de remplacement. On observe alors la mise en place d'une suppléance buccale afin de maintenir la fonction ventilatoire. La respiration buccale nouvellement

établie peut être divisée en deux composantes : une absence de respiration nasale et une ouverture chronique de la bouche (Schlenker *et al.*, 2000).

Cette transition est susceptible de perturber l'ensemble des fonctions nasales et d'engendrer de nombreuses conséquences tant sur le plan local que sur les plans régional ou général (figure 1). En effet, les cavités nasales constituent une interface essentielle entre les différents espaces caverneux de la face. Elles sont reliées non seulement aux sinus paranasaux et au nasopharynx, mais également à la bouche, à l'œil et à l'oreille moyenne. De plus, chez le mammifère en développement, la ventilation nasale se double d'une fonction morphométrique mettant en jeu l'expansion volumétrique des cavités nasales par le flux aérien (Moss, 1969). L'obstruction nasale est donc susceptible de provoquer des effets délétères sur l'ensemble de ces structures régionales. Afin de rester succinct, les impacts régionaux de l'obstruction nasale ne seront pas abordés ici. Sur le plan général, l'obstruction nasale a deux conséquences principales, l'hypoxie et l'hyposmie. L'hypoxie désigne tout état dans lequel les tissus reçoivent une quantité d'oxygène insuffisante à leur fonctionnement. Elle trouve son origine dans les troubles respiratoires consécutifs à la mise en place de la respiration buccale. L'hyposmie correspond à une diminution générale de la sensibilité olfactive (Kimmelman, 1993), elle est directement liée à l'absence de respiration nasale. Au cours du développement postnatal, l'hyposmie est susceptible d'affaiblir la perception de l'environnement et par là même de perturber l'ensemble des processus d'acquisition (par exemple l'activité exploratrice) liés à l'olfaction.

La revue bibliographique présentée ici aborde les conséquences générales de l'obstruction nasale. Dans un premier temps, nous nous intéresserons aux troubles respiratoires associés à l'obstruction des narines. Nous verrons qu'en modifiant le comportement respiratoire, l'obstruction nasale est susceptible d'influencer l'activité électromyographique des muscles oro-faciaux. Dans un second temps, nous aborderons les conséquences de l'obstruction nasale précoce sur la fonction olfactive. Finalement, nous verrons qu'en perturbant la respiration et l'olfaction, l'obstruction nasale pourrait constituer une situation stressante multifactorielle susceptible de perturber le développement de certains systèmes physiologiques périphériques.



**Figure 1.** Structures et comportements susceptibles d'être touchés par l'obstruction nasale. Du fait de la position particulière du nez, situé au cœur du massif facial, à l'interface entre l'air ambiant et les voies aériennes inférieures; les retentissements de l'obstruction nasale peuvent être multiples.

## 1.1 Obstruction nasale et troubles respiratoires

### 1.1.1 La ventilation nasale

En conditions physiologiques, la ventilation s'effectue par la filière nasale, éventuellement suppléé par la bouche lors d'efforts physiques ou d'encombrement temporaire des voies nasales (Pohunek, 2004). Au niveau des cavités nasales, le débit aérien est régulé par les valvules narinaires contrôlées par les muscles alaires qui réalisent des mouvements symétriques et synchronisés avec les mouvements respiratoires (Cole, 2003). D'autre part, l'alternance de surfaces concaves et convexes freine l'air en provoquant la formation de turbulences. Cet écoulement turbulent jouerait un rôle essentiel dans la croissance des cavités nasales (Churchill *et al.*, 2004). Le ralentissement du flux aérien permet en outre d'améliorer le conditionnement de l'air inspiré (Churchill *et al.*, 2004). Les cavités nasales assurent en effet le conditionnement de l'air de façon à optimiser les échanges gazeux dans les poumons (Ingelstedt, 1956). Elles possèdent ainsi la capacité de chauffer et d'humidifier l'air inhalé, ce conditionnement s'effectue particulièrement dans le segment nasal antérieur qui possède les caractéristiques anatomiques nécessaires (Keck *et al.*, 2000).

L'absence de ventilation nasale a de nombreuses conséquences sur les plans local et régional :

- Assèchement des muqueuses nasale et buccale (Blaugrund, 1989; Svensson *et al.*, 2006).
- Accumulation de CO<sub>2</sub> dans les sinus paranasaux (Ganjian *et al.*, 1999).
- Altération du drainage mucociliaire (Raji *et al.*, 2001).
- Manifestations otologiques, ophtalmologiques et morphométriques délétères (Buchman *et al.*, 1999; Gola *et al.*, 2002; Shikata *et al.*, 2004).

Cette transition a également des conséquences importantes sur le plan général. En effet, non seulement la respiration buccale forcée pourrait perturber l'alimentation du fait de la compétition entre les processus respiratoire et alimentaire (Erkan *et al.*, 1994), mais elle influe également sur l'homéostasie gazeuse du sang et sur l'activité électromyographique des muscles oro-faciaux.

### 1.1.2 Obstruction nasale et homéostasie gazeuse du sang

La respiration buccale est moins efficace que la respiration nasale dans le conditionnement de l'air inspiré. Le passage à la respiration buccale entraîne en effet un assèchement et un refroidissement de l'air inhalé comparée aux valeurs mesurées lors d'une respiration nasale normale (Morton *et al.*, 1995). Ces modifications altèrent

l'optimisation des échanges gazeux dans les poumons et l'obstruction nasale se traduit ainsi par une hypoxie, une hypercapnie et une acidémie (Harding *et al.*, 1987; Tacx et Strack Van Schijndel, 2003). Ces modifications ont été observées à des degrés divers chez le rat (Erkan *et al.*, 1994), le lapin (Ramadan, 1983), la brebis (Harding *et al.*, 1991), le chien (Cavo *et al.*, 1975) et l'être humain (Cvetnic *et al.*, 1981). Chez les animaux à respiration nasale obligatoire comme le rat, cette insuffisance respiratoire est susceptible d'être renforcée par la forte résistance des voies aériennes oro-pharyngées (Kalogjera *et al.*, 1991).

D'autre part, comparativement à l'adulte, le ratio résistance nasale / résistance buccale est plus faible chez l'individu juvénile (Mortola et Fisher, 1981). Par conséquent, la respiration nasale est prépondérante au cours de la période néonatale chez la plupart des espèces de mammifères. Les études chez la brebis montrent qu'en cas d'obstruction nasale, les perturbations de l'homéostasie gazeuse du sang sont plus marquées chez le nouveau-né (Harding *et al.*, 1991). En effet, plus l'agneau est jeune, plus le pH et la pression partielle en O<sub>2</sub> diminuent fortement. De plus, la pression partielle en CO<sub>2</sub> augmente de façon plus importante chez le nouveau-né et continue à augmenter même après la mise en place de la respiration buccale (Harding *et al.*, 1987). Ces résultats peuvent être expliqués par l'immaturité des mécanismes permettant l'établissement et le maintien d'une voie aérienne de remplacement (Harding et Wood, 1990). La capacité à maintenir une voie aérienne buccale augmente ainsi avec l'âge du fait de la maturation des chémorécepteurs sanguins d'une part, et des mécanorécepteurs des voies aériennes d'autre part (Harding *et al.*, 1995).

### 1.1.3 Obstruction nasale et activité des muscles oro-faciaux

L'absence de flairage et l'ouverture chronique de la bouche constituent des variations de conditions de travail susceptibles de modifier de manière spécifique l'activité des muscles oro-faciaux. Ainsi, alors que l'obstruction nasale inhibe l'activité électromyographique du masséter chez le chat, l'activité électromyographique du diaphragme n'est pas affectée (tableau 1 - Ono *et al.*, 1998). De la même façon, l'activité du muscle *orbicularis oris*, impliqué dans la fermeture des lèvres, est inhibée lors du passage à la respiration buccale (Song et Pae, 2001). Ces résultats suggèrent que la respiration buccale inhibe l'activité électromyographique des muscles responsables de la fermeture de la mâchoire. À l'inverse, au travers l'activation de mécanorécepteurs, le passage à la respiration buccale stimule l'activité électromyographique des muscles de l'oropharynx tels que les muscles supra-hyoïdiens, facilitant ainsi la respiration (Hiyama *et al.*, 2003). La respiration buccale entraîne également une augmentation de l'activité du muscle *levator*

<b>Muscles</b>	<b>Fonction(s)</b>	<b>Effets de la respiration buccale sur l'activité électromyographique</b>	<b>Références</b>
<b>Masséter</b>	Fermeture de la bouche	-	Ono <i>et al.</i> , 1998
<b>Orbicularis oris</b>	Fermeture des lèvres	-	Song et Pae, 2001
<b>Palatoglosse</b>	Abaisseur voile du palais Elévateur de la langue	-	Tangel <i>et al.</i> , 1995
<b>Alae nasi</b>	Dilatateur des ailes du nez	-	Shi <i>et al.</i> , 1998
<b>Supra-hyoïdiens</b>	Elévation du larynx Ouverture de la bouche...	+	Hiyama <i>et al.</i> , 2003
<b>Levator palatini</b>	Elévateur du voile du palais	+	Tangel <i>et al.</i> , 1995
<b>Genioglosse</b>	Dépresseur de la langue	0	Williams <i>et al.</i> , 2000
<b>Diaphragme</b>	Muscle inspirateur principal	0	Ono <i>et al.</i> , 1998

**Tableau 1.** Effets spécifiques de la respiration buccale forcée ou volontaire sur l'activité électromyographique des muscles ventilatoires. - : inhibition, + : stimulation, 0 : pas d'effet.

*palatini*, élévateur du voile du palais, et une diminution de l'activité du muscle palatoglosse qui isole la cavité buccale des voies aériennes supérieures en se contractant (Tangel *et al.*, 1995). Enfin, chez l'Homme en exercice, le passage à la respiration buccale inhibe l'activité du muscle dilateur des ailes du nez tandis que l'activité du muscle genioglosse, dépresseur de la langue, n'est pas affectée (Shi *et al.*, 1998; Williams *et al.*, 2000). L'absence de respiration nasale engendre donc d'importantes modifications de l'activité électromyographique des muscles des voies aériennes supérieures, ces variations agissent de manière synergique de façon à libérer une voie aérienne buccale permettant de maintenir la pérennité de la fonction ventilatoire.

## 1.2 Obstruction nasale et troubles olfactifs

### 1.2.1 Obstruction nasale et développement du système olfactif

Au cours de la période postnatale, le système olfactif présente un niveau important de croissance et de maturation caractérisée par une prolifération massive de cellules (Weiler et Farbman, 1997). Le développement correct des éléments constitutifs du système olfactif et le maintien des fonctions olfactives nécessitent un minimum de stimulation sensorielle (Brunjes, 1994). L'obstruction néonatale des narines se traduit ainsi par des changements anatomiques, physiologiques et neurochimiques importants au sein du système olfactif (Brunjes *et al.*, 1985; Philpot *et al.*, 1998).

L'**obstruction nasale unilatérale** produit en effet une atrophie importante de la muqueuse et du bulbe olfactif ipsilatéral (Najbauer et Leon, 1995; Brunjes et Shurling, 2003). En l'absence de stimulation sensorielle, on constate une diminution du nombre de cellules au sein de la muqueuse olfactive. Le manque d'afférence en provenance de la muqueuse entraîne à son tour une baisse du nombre de cellules au sein du bulbe olfactif. Deux hypothèses non exclusives ont été avancées pour expliquer la diminution du nombre de cellules sensorielles au sein de la muqueuse olfactive : l'obstruction nasale entraînerait une baisse de la prolifération des cellules basales et/ou une augmentation de l'apoptose des neurones sensoriels nouvellement formés (Farbman *et al.*, 1988; Bauer *et al.*, 2003). En effet, ces cellules seraient dans l'incapacité de trouver un support trophique adéquat au niveau du bulbe olfactif (Farbman et Buchholz, 1996). De plus, des travaux récents suggèrent qu'en l'absence de stimulation sensorielle, les neurorécepteurs matures enverraient un signal susceptible d'inhiber la prolifération cellulaire (Wu *et al.*, 2003). Cependant, il semble qu'il faille au moins 15 jours d'obstruction unilatérale pour constater un effet sur le développement relatif des différentes couches du bulbe olfactif ipsilatéral (Cummings et Brunjes, 1997). De plus, certaines données anatomiques

(Burdach et Doty, 1987), comportementales (Slotnick et Pazos, 1990) et immunohistochimiques (Brinon *et al.*, 2001) suggèrent que l'obstruction nasale unilatérale ne soit pas suffisante pour empêcher intégralement la stimulation du bulbe olfactif ipsilatéral.

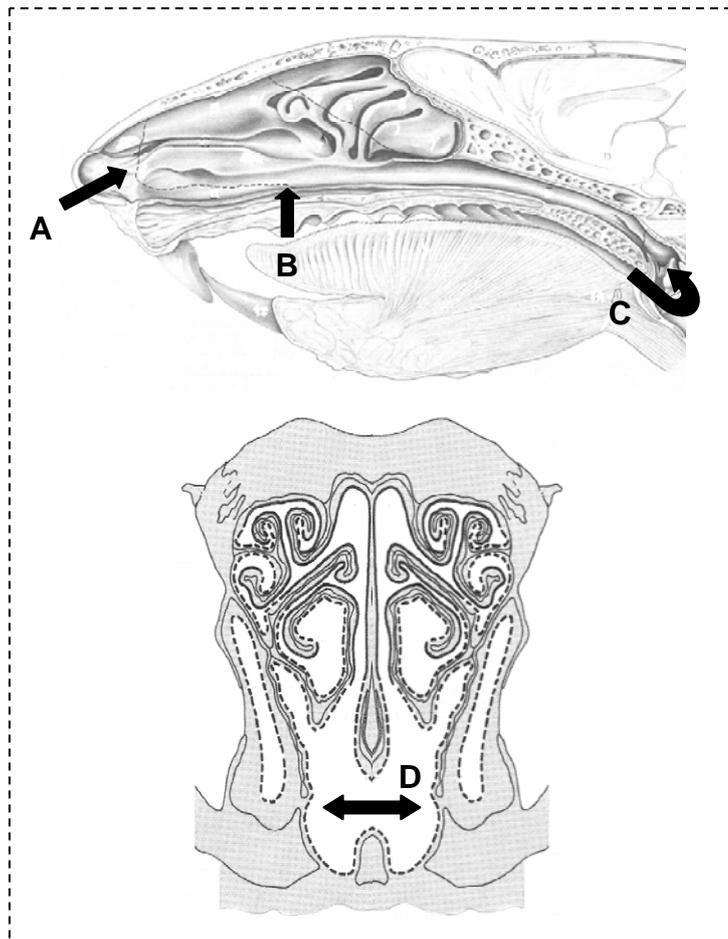
En revanche, une **obstruction nasale bilatérale** produit un changement rapide du système catécholaminergique du bulbe olfactif (Brinon *et al.*, 2001). Ces modifications sont susceptibles d'entraîner une hyposmie générale, c'est-à-dire touchant l'ensemble des stimuli chimiques (Kimmelman, 1993), bien que les molécules odorantes puissent théoriquement atteindre la muqueuse olfactive par l'intermédiaire du canal nasopalatin (figure 2 - Weiler et Farbman, 2003) ou du nasopharynx (Slotnick et Pazos, 1990; Coppola *et al.*, 1994). Dans tous les cas, la néoneurogénèse caractéristique du système olfactif autorise la réversibilité de ces modifications. Ainsi, Mirich et Brunjes (2001) ont montrés que suite à une obstruction nasale bilatérale réalisée chez le rat du 1<sup>er</sup> au 20<sup>ème</sup> jour post-natal, le retour à une respiration normale induisait une nette augmentation de la prolifération des précurseurs neuronaux et que l'épaisseur de l'épithélium olfactif principal était restauré dans les cinq jours suivant la réouverture des narines. D'autre part, il semble que lorsque cette obstruction est réalisée le 5<sup>ème</sup> jour postnatal, les conséquences sur l'épaisseur de l'épithélium olfactif et sur la prolifération neuronale secondaire soient beaucoup moins marquées (Stahl *et al.*, 1990).

Malgré ces importantes modifications anatomiques et physiologiques au sein du système olfactif, il existe peu de données bibliographiques sur les impacts comportementaux de l'obstruction nasale précoce. Chez de nombreuses espèces de mammifères, la communication chimique joue pourtant un rôle de premier plan dans la mise en place des comportements au cours de la période postnatale.

### 1.2.2 Privation olfactive et comportements précoces

L'olfaction joue un rôle primordial dans les relations qu'entretiennent les animaux avec leur environnement social et physique, il permet notamment la mise en place des mécanismes d'orientation, attraction ou évitement, en fonction des caractéristiques du stimulus.

L'apprentissage des odeurs familières chez les mammifères débute *in utero via* le liquide amniotique (Schaal et Orgeur, 1992). L'acquisition et le stockage des informations olfactives se poursuivent à la naissance. Ainsi, les mères lactantes de plusieurs espèces de rongeurs émettent des signaux chimiques attractifs uniquement pour leurs jeunes qui s'orientent préférentiellement vers les sites saturés de l'odeur maternelle (Leon et Moltz, 1971).



**Figure 2.** Voies d'entrée des stimuli chimiques dans les cavités nasales. Schémas d'après Hebel et Stromberg (1976).

**(A) Voie orthonasale :** les molécules pénètrent dans la cavité nasale par la narine.

**(B) Voie bucco-nasale :** lors de l'alimentation, les molécules pénétreraient dans la cavité nasale par le conduit nasopalatin.

**(C) Voie rétronasale :** les molécules exhalées au cours la mastication atteignent l'épithélium olfactif par le nasopharynx (les stimuli chimiques sont transportés par le flux expiratoire suivant la déglutition).

**(D) Voie internasale :** les molécules passent d'une narine à l'autre par l'intermédiaire du nasopharynx.

Le nid maternel est donc imprégné d'odeurs qui délimitent le territoire des jeunes, restreignent et orientent leurs déplacements. Chez le rat, l'odeur du nid représente un stimulus attractif dès le 3<sup>ème</sup> jour postnatal (Cornwell-Jones et Sobrian, 1977) ; le jeune présente alors des préférences olfactives pour son propre nid par rapport à un nid étranger (Brown, 1982). Les jeunes rats préfèrent toutefois s'orienter vers l'odeur de leur mère que vers l'odeur de leur nid (Polan et Hofer, 1998). Les signaux olfactifs induisent également des préférences filiales pour le regroupement des ratons au sein du nid (Brunjes et Alberts, 1979). Cette préférence est supprimée par l'anosmie chimique au sulfate de zinc bien que le regroupement ne soit pas éliminé pour autant (Alberts et Brunjes, 1978). De plus, Terry et Johanson (1996) ont montré qu'à la naissance, les jeunes rats développent une attirance pour des odeurs lorsqu'elles sont associées à des stimuli de renforcement positif comme les soins maternels (toiletage, léchage anogénital, infusion buccale de lait). Le conditionnement olfactif du jeune favorise ainsi l'activité motrice orientée vers la mamelle, l'apparition d'un comportement de vigilance et les premiers apprentissages comme la sélectivité alimentaire (Nowak *et al.*, 2000; Coureaud *et al.*, 2001). La bulbectomie olfactive bilatérale, effectuée sur de jeunes rongeurs, entraîne des difficultés d'orientation vers les mamelles, une diminution du taux d'attachement aux mamelles et un retard de croissance (Singh et Tobach, 1975; Risser et Slotnick, 1987). Les signaux chimiques, outre la reconnaissance du nid et des partenaires sociaux, permettent également l'orientation des jeunes vers les mamelles maternelles et jouent donc un rôle de premier plan dans l'expression du comportement alimentaire.

En cas d'obstruction nasale des cavités nasales, la compétition entre les processus respiratoire et alimentaire pourrait constituer un facteur renforçant les impacts de la privation olfactive sur l'alimentation. Cette compétition pourrait notamment perturber la saisie orale des mamelles et limiter le rythme d'ingestion du lait maternel. On sait que chez les mammifères, une privation de lait maternel de courte durée induit des perturbations endocriniennes telles qu'une inhibition de l'axe thyroïdien et une hypercorticotéronémie (Oberkotter, 1988; Schmidt *et al.* 2002). En jouant sur la prise alimentaire, l'hyposmie associée à l'obstruction nasale pourrait donc perturber de manière importante l'homéostasie hormonale du jeune en développement.

### 1.3 Obstruction nasale et réponse au stress

Au cours de la période postnatale, l'obstruction nasale bilatérale est susceptible d'entraîner :

- Une détresse respiratoire en altérant le conditionnement de l'air inspiré.
- Une privation sociale partielle en perturbant l'orientation vers les congénères.
- Des perturbations nutritionnelles et hydriques en perturbant l'orientation vers les mamelles (le lait maternel représente l'unique source hydrique du nouveau-né).
- Un déséquilibre thermique en perturbant l'orientation vers la mère et le nid (chez les espèces nidicoles uniquement).

Ces différents facteurs sont connus pour leur capacité à stimuler la réponse neuro-endocrine au stress. L'obstruction nasale bilatérale pourrait donc constituer une situation stressante multi-factorielle. Dans le cas où elle se traduirait effectivement par la mise en place d'une réponse au stress, l'obstruction nasale représenterait une situation stressante chronique, c'est-à-dire une perturbation relativement modérée se prolongeant sur plusieurs jours (Pacak et Palkovits, 2001).

#### 1.3.1 La réponse au stress chronique

Selye (1950) fut le premier à proposer une véritable théorie concernant le stress et ses effets sur l'organisme. Cette théorie, connue sous le nom de Syndrome Général d'Adaptation, comprend trois étapes successives. La première étape correspond à une phase d'alarme ou phase initiale de la réponse. Elle correspond au choc physiologique suivant la perception du facteur de stress. La phase d'alarme est suivie par la phase de résistance, ou phase d'adaptation, au cours de laquelle l'organisme tente de rétablir son homéostasie. Si la perturbation est trop importante, l'équilibre ne peut pas être rétabli et l'organisme entre alors dans une phase d'épuisement conduisant à l'apparition de divers effets délétères.

Aujourd'hui, le terme de "réponse au stress" désigne un ensemble de réactions cognitives, comportementales et physiologiques (tableau 2) permettant de maintenir l'homéostasie d'un organisme soumis à une situation défavorable (Lazarus et Folkman, 1984; Chrousos, 1998). Les réactions physiologiques font intervenir deux systèmes neuroendocriniens couplés mais relativement autonomes (Chrousos, 1998) : l'axe catécholaminergique qui intervient principalement dans la phase initiale de la réponse (phase aiguë) et l'axe corticotrope, particulièrement impliqué dans la phase de résistance (phase chronique).

---

### Adaptations cognitives

- **Évaluation primaire** : établissement d'une représentation interne de la situation
  - **Évaluation secondaire** : autoévaluation en fonction du contexte
  - **Mise en place d'une stratégie d'ajustement au facteur de stress** :  
Évitement, confrontation, modification...  
Ajustement de la motivation
  - **Réévaluation éventuelle** : en fonction de nouveaux éléments
- 

### Adaptations comportementales

- **Activation de comportements adaptatifs**  
Vigilance, excitation et/ou agressivité accrues  
Attention focalisée sur le facteur de stress
  - **Inhibition de comportements non immédiatement nécessaires**  
Inhibition du comportement reproducteur  
Inhibition de la prise alimentaire (sauf en cas de stress nutritionnel)
- 

### Adaptations physiologiques

- **Primaire** : réponse neuroendocrine  
Sécrétion de neuropeptides, de catécholamines et de corticostéroïdes
  - **Secondaire** : redistribution des substrats vitaux  
Acheminement de l'O<sub>2</sub> et des nutriments vers le SNC, certains muscles et les systèmes biologiques lésés  
Augmentation de la fréquence cardiaque  
Augmentation de la fréquence respiratoire  
Stimulation de la glycogénolyse, de la gluconéogenèse et de la lipolyse
  - **Tertiaire** : inhibition des systèmes physiologiques non immédiatement nécessaires  
Inhibition de l'axe reproducteur  
Inhibition des axes somatotrope et thyroïdien (croissance)  
Inhibition de la digestion
- 

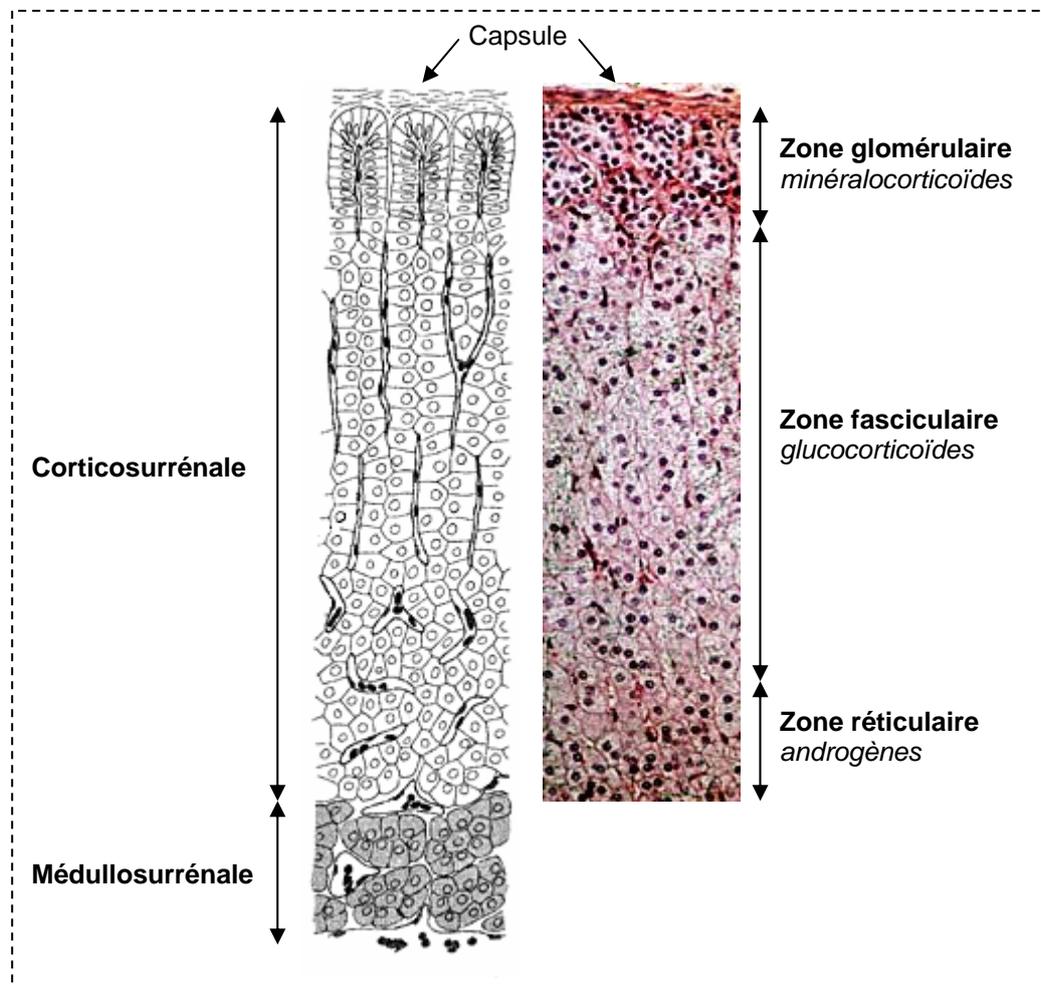
**Tableau 2.** Principales adaptations cognitives, comportementales et physiologiques au cours de la réponse neuroendocrine au stress chez les vertébrés. SNC : système nerveux central. *D'après Chrousos, 1998; modifié d'après Lazarus et Folkman, 1984.*

L'activation de l'axe corticotrope débute par une stimulation de l'hypothalamus par le système limbique et l'amygdale. Cette stimulation conduit à la libération de corticolibérine (CRH) dans le système porte hypophysaire. La CRH est le principal régulateur de la sécrétion d'hormone adrénocorticotrope (ACTH) par l'adénohypophyse (Chrousos et Gold, 1992). En réponse à l'ACTH, les cellules stéroïdogènes des glandes corticosurrénales utilisent le cholestérol pour produire des hormones stéroïdes (figure 3). Parmi celles-ci, les glucocorticoïdes (cortisol et corticostérone) constituent les effecteurs finaux de la réponse neuroendocrine au stress (Ottaviani et Franceschi, 1996). En effet, lorsqu'un animal fait face à un facteur de stress, les concentrations plasmatiques en cortisol (chez la plupart des mammifères) et en corticostérone (chez les rongeurs notamment) augmentent plus ou moins rapidement en fonction de la nature, de l'intensité et de la durée de la perturbation.

### 1.3.2 Fonctions des glucocorticoïdes

L'activité des glucocorticoïdes est principalement liée au métabolisme glucidique, lipidique et protéique. La sécrétion de glucocorticoïdes entraîne ainsi une lyse des réserves énergétiques et une hyperglycémie (Ottaviani et Franceschi, 1996). Il s'agit en fait d'une redistribution globale de l'énergie de façon à faciliter l'adaptation de l'organisme. Cette redistribution se fait au détriment de certaines fonctions physiologiques n'étant pas immédiatement nécessaires. L'axe thyroïdien et certaines fonctions immunitaires se trouvent ainsi inhibées (Chrousos et Gold, 1992; Chrousos, 1998). Cependant, certains types de stress, en particulier l'hypothermie, stimulent la production des hormones thyroïdiennes (Fukuhara *et al.*, 1996) démontrant ainsi la pluralité et la grande spécificité de la réponse au stress. En résumé, les fonctions thyroïdiennes et immunitaires non immédiatement nécessaires sont temporairement inhibées de manière à effectuer une redistribution adaptative de l'énergie.

Les glucocorticoïdes exercent par ailleurs un rétrocontrôle négatif sur les éléments centraux de l'axe corticotrope afin de protéger l'individu d'une réponse disproportionnée. En effet, lorsque la concentration en glucocorticoïdes reste élevée de manière chronique, on rentre dans une phase d'épuisement et la réponse au stress perd ses propriétés adaptatives. On constate ainsi l'apparition de divers effets délétères susceptibles d'être majorés au cours de la période de développement. Ainsi, la diminution de la sécrétion d'hormones thyroïdiennes peut inhiber la croissance musculaire, la croissance osseuse et la maturation du système nerveux central (Koibuchi et Iwasaki, 2006). Chez les rongeurs, l'hypothyroïdisme postnatal retarde par exemple la prolifération et la migration des cellules granulaires, diminue l'arborisation dendritique des cellules de Purkinje et réduit la



**Figure 3.** Structure histologique des glandes surrénales chez les mammifères. La médullosurrénale sécrète les catécholamines impliquées dans la phase initiale de la réponse au stress. La corticosurrénale utilise le cholestérol pour sécréter des hormones stéroïdes. Elle est divisée en trois zones plus ou moins spécialisées dans la synthèse d'un type d'hormone : la zone glomérulaire produit des minéralocorticoïdes comme l'aldostérone, la zone fasciculaire sécrète les glucocorticoïdes (cortisol et corticostérone) et la zone réticulaire produit principalement des androgènes.

synaptogénèse (Oppenheimer et Schwartz, 1997; Koibuchi et Chin, 2000). La sécrétion prolongée de glucocorticoïdes peut également entraîner un épuisement des réserves énergétiques. On observe alors des problèmes de croissance liés parfois à des atrophies musculaires (Munck *et al.*, 1984; Hartmann *et al.*, 1999).

L'axe corticotrope, *via* les différentes fonctions des glucocorticoïdes, constitue donc une interface essentielle entre le système nerveux central et les systèmes physiologiques périphériques. Il présente en particulier d'importantes interactions avec le système immunitaire.

### 1.3.3 Impacts sur le système immunitaire

Le système immunitaire assure et maintient l'intégrité des organismes vivants vis-à-vis d'agressions externes physiques, chimiques ou infectieuses, ou vis-à-vis de dysfonctionnements internes, essentiellement tumoraux. Chez les mammifères l'immunité est classiquement divisée en deux composantes : l'immunité non spécifique (immunité innée) et l'immunité spécifique (immunité acquise ou adaptatrice). La réponse non spécifique est la première à se mettre en place, elle fait intervenir les phénomènes inflammatoires au sein desquels les polynucléaires et les macrophages jouent le rôle principal. Lorsque ces moyens sont insuffisants, la réponse spécifique intervient avec la mise en jeu des lymphocytes. *Via* l'existence de médiateurs et de récepteurs communs, le système immunitaire est étroitement lié au système endocrinien et au système nerveux central. Il présente notamment des interactions réciproques très importantes avec l'axe corticotrope (Besedovsky et Del Rey, 1996). Cette relation bidirectionnelle joue un rôle de premier plan dans le maintien de l'homéostasie (Blalock, 1994).

On considère généralement que les glucocorticoïdes ont un impact supprimeur sur le système immunitaire (Munck *et al.*, 1984). Toutefois, les conséquences du stress varient en fonction du type de stress, de l'âge et du sexe des individus, de l'espèce et des paramètres immunitaires étudiés (Shanks et Lightman, 2001). Les facteurs de stress peuvent ainsi affecter différemment la réponse immunitaire non-spécifique et la réponse immunitaire spécifique, l'immunité systémique et l'immunité des muqueuses (Dhabhar *et al.*, 2000).

À un niveau physiologique, les glucocorticoïdes jouent un rôle important dans le développement, la différenciation, l'homéostasie et les fonctions des cellules T (Ashwell *et al.*, 2000; Pazirandeh *et al.*, 2002) comme des cellules B (Cupic *et al.*, 2005). En conditions stressantes, l'excès de glucocorticoïdes a une action inhibitrice sur la croissance et la prolifération des cellules lymphoïdes (Munck et Guyre, 1986; Bateman *et*

*al.*, 1989). Le thymus est particulièrement sensible à l'action délétère des glucocorticoïdes (Bodey *et al.*, 1999). Ceux-ci entraînent par exemple un accroissement de l'apoptose des thymocytes (Tarcic *et al.*, 1998; Dreau *et al.*, 1999; Kofler, 2000) et une réduction de leur prolifération (Shanks *et al.*, 2000; Groer *et al.*, 2002) ce qui se traduit par une involution du thymus (Tarcic *et al.*, 1998; Ashwell *et al.*, 2000; Eskandari et Sternberg, 2002). En ce qui concerne les lymphocytes B, plus les cellules sont matures, plus elles semblent sensibles à l'impact apoptotique des glucocorticoïdes même si cette sensibilité semble décliner une fois le lymphocyte B activé (Andreau *et al.*, 1998). Cet impact des glucocorticoïdes sur la maturation des lymphocytes au sein des organes lymphoïdes primaires est susceptible d'avoir un impact sur le répertoire des lymphocytes matures.

D'autre part, une diminution du nombre absolu de leucocytes sanguins sous l'effet des glucocorticoïdes a été rapportée chez la souris (Dhabhar *et al.*, 2000), le rat (Stefanski *et al.*, 1996), le lapin (Toft *et al.*, 1993), le renard (Moe et Bakken, 1997) et les primates (Morrow-Tesch *et al.*, 1993). Cette diminution reflète en fait une redistribution adaptative des leucocytes vers la moelle osseuse, la peau et certains ganglions lymphatiques. La baisse du nombre de leucocytes sanguins touche à des degrés divers les sous-populations de lymphocytes. La diminution du nombre de cellules B semble effectivement plus importante que celle des lymphocytes T (Dhabhar *et al.*, 1995).

En ce qui concerne la réponse immunitaire spécifique, les glucocorticoïdes semblent favoriser la réponse à médiation humorale au dépend de la réponse à médiation cellulaire (Elenkov et Chrousos, 1999; Agarwal et Marshall, 2001), bien que dans certains cas la réponse cellulaire puisse également être stimulée (Dhabhar *et al.*, 2000). On constate ainsi une diminution de la sécrétion de l'IL-12 par les lymphocytes Th1 et une augmentation de la sécrétion d'IL-4 et d'IL-10 par les lymphocytes Th2 (Elenkov, 2004). Cette transition vers la réponse à médiation humorale pourrait empêcher une sécrétion disproportionnée de cytokines pro-inflammatoires susceptible d'endommager les tissus.

En provoquant la mise en place d'une réponse au stress, l'obstruction nasale bilatérale pourrait donc fortement affecter le développement du système immunitaire. Ces effets pourraient comprendre une atrophie des organes lymphoïdes, une diminution de la prolifération des lymphocytes, une augmentation de leur apoptose et une perturbation de l'immunité spécifique.

## 1.4 Objectifs du travail expérimental

En définitive, en jouant sur les fonctions respiratoire et olfactive (figure 4), l'obstruction nasale bilatérale pourrait :

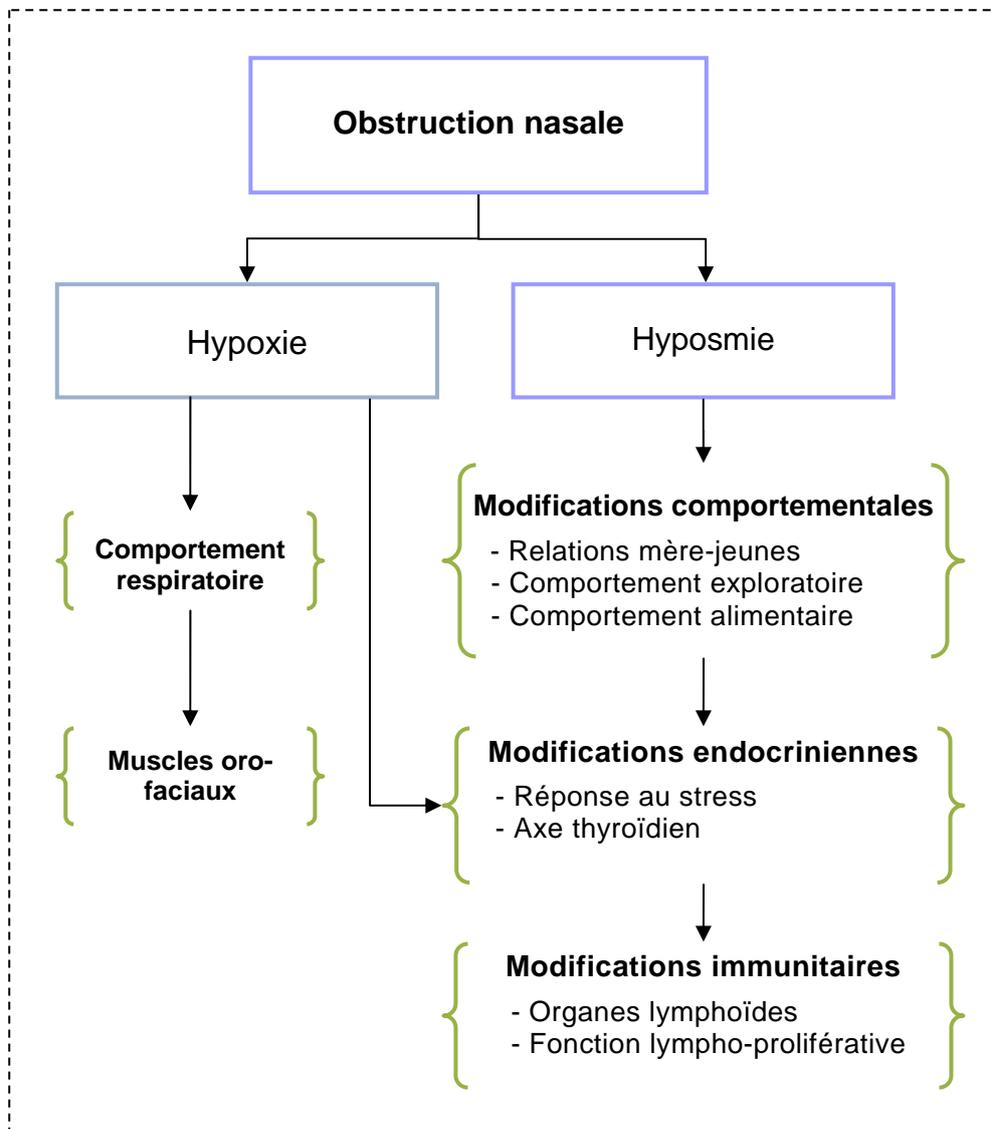
- Modifier le comportement respiratoire et le développement des muscles oro-faciaux.
- Perturber les relations mère-jeunes, le comportement exploratoire et le comportement alimentaire.
- Constituer une situation stressante multifactorielle susceptible d'influencer le développement du système immunitaire.

C'est pourquoi, l'objectif de ce travail expérimental est de tester si une obstruction nasale bilatérale réversible peut perturber le développement comportemental et physiologique du jeune mammifère. Contrairement à la plupart des études qui aborde les conséquences de l'obstruction nasale sur un plan local ou régional (croissance crânio-faciale, développement du système olfactif, physiologie respiratoire...), l'obstruction nasale est envisagée ici comme une situation multifactorielle dont l'étude nécessite une approche pluridisciplinaire. Il s'agit d'un travail fondamental se situant dans le cadre général du fonctionnement des organismes.

Le rat (*Rattus norvegicus*) a été choisi comme animal expérimental car il constitue un modèle de choix pour étudier les effets d'une obstruction nasale précoce. Outre le fait que les rongeurs immatures soient parmi les sujets expérimentaux les plus utilisés en recherche fondamentale et biomédicale (Branchi *et al.*, 2003), le rat possède des paramètres de croissance nasale (en termes de longueurs, de largeurs et de surfaces) présentant un pourcentage d'homologie important avec ceux de plusieurs espèces de mammifères (Losken *et al.*, 1994). De plus, du fait de leur durée de vie relativement courte et de leur remarquable capacité de reproduction, l'utilisation de rongeurs favorise la réalisation des études à court terme tout en minimisant les problèmes éthiques posés par l'utilisation de grands mammifères. Ainsi, le choix du modèle animal dépend généralement d'un compromis entre des critères scientifiques, éthiques et pratiques. Le rat est sans doute le modèle le plus utilisé pour les études fondamentales sur l'obstruction nasale.

Après avoir présenté le modèle expérimental et les méthodes générales, le travail expérimental exposé dans ce mémoire sera divisé en trois parties :

- La première vise à valider la méthode d'obstruction nasale réversible en contrôlant la réouverture des narines. Nous vérifierons également que les modifications comportementales et physiologiques observées ne sont pas liées à une inhibition du comportement maternel.



**Figure 4.** Hypothèses à la base du travail expérimental : par l'intermédiaire de l'hypoxie et de l'hyposmie, l'obstruction nasale pourrait induire des modifications comportementales et endocriniennes et de ce fait, altérer la structure et le fonctionnement des muscles oro-faciaux et du système immunitaire.

- Dans la deuxième partie, nous observerons, dans le cadre des processus d'acquisition, les conséquences de l'obstruction nasale bilatérale sur l'activité exploratrice des jeunes.
- Enfin, la troisième partie regroupe les incidences physiologiques de l'obstruction nasale bilatérale. Elle aborde le développement des muscles oro-faciaux, la prise alimentaire, la croissance, les taux de corticostérone, d'hormones thyroïdiennes et le développement des organes lymphoïdes suite à l'induction d'une obstruction nasale précoce.

# 2

## Modèle expérimental et méthodes générales



## 2 Modèle expérimental et méthodes générales

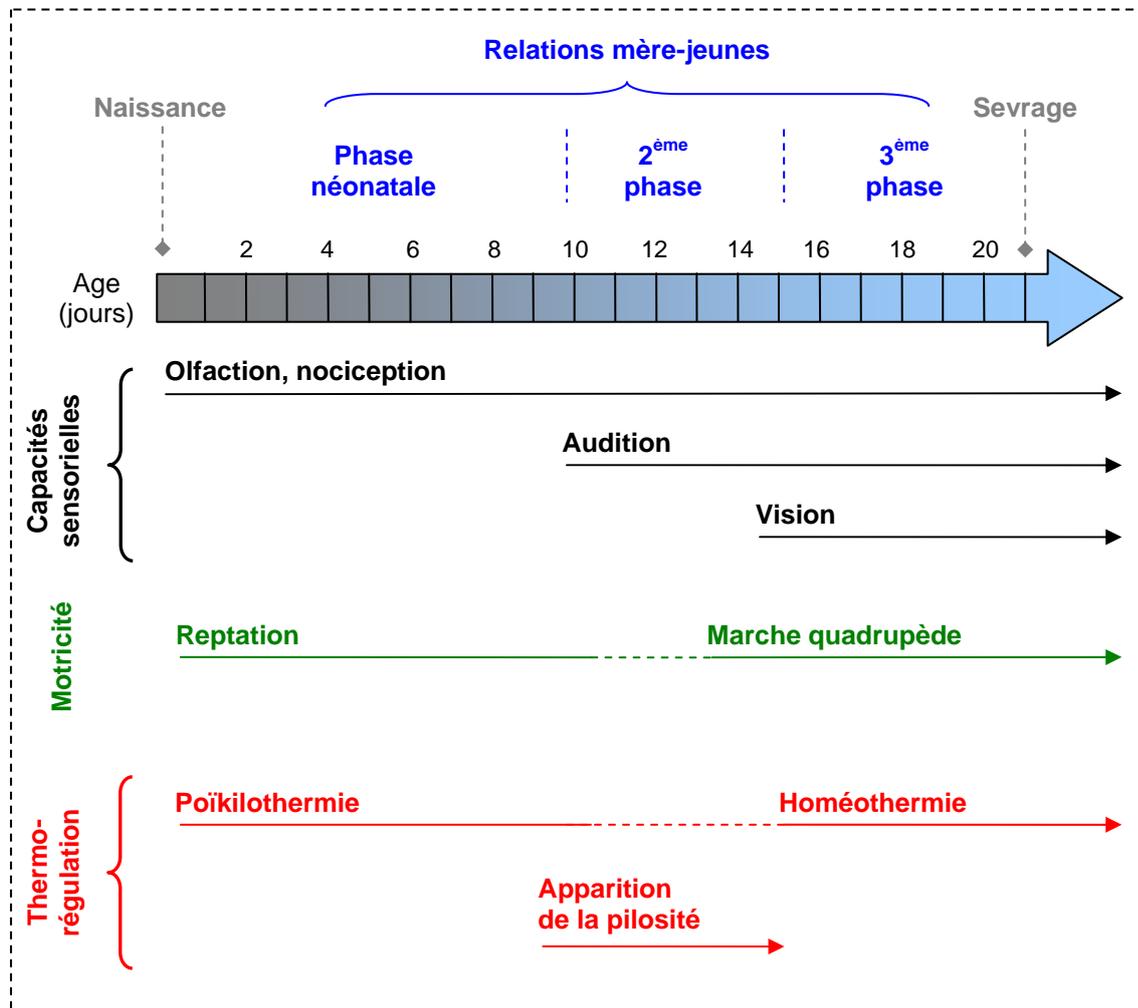
### 2.1 Modèle animal

Le travail expérimental présenté dans ce mémoire est effectué sur le rat de laboratoire (*Rattus norvegicus* de souche Wistar, iops IFFA-CREDO). Le rat possède un développement cérébral post-natal, c'est-à-dire que son système nerveux est encore largement immature à la naissance. Les relations mère-jeunes évoluent parallèlement au développement neurosensoriel des ratons (figure 5) et peuvent être divisées en trois phases successives (Lee et Williams, 1977) :

- Une **1<sup>ère</sup> phase** d'environ 10 jours, pendant laquelle la mère joue le rôle principal en s'approchant des petits dans le nid. C'est elle qui stimule les jeunes et qui initie les événements alimentaires. Durant cette phase, les activités du nouveau-né sont essentiellement alimentaires.
- La **2<sup>ème</sup> phase** constitue une étape importante du développement neurosensoriel et moteur des ratons. Ils acquièrent progressivement l'audition (à partir du 10<sup>ème</sup> jour), la locomotion quadrupède (autour du 12<sup>ème</sup> jour), la vision (vers 14 jours) et l'endothermie (jusqu'au 15<sup>ème</sup> jour). Le comportement des jeunes évolue parallèlement au développement physiologique : il y a apparition du comportement exploratoire et les jeunes s'éloignent progressivement du nid maternel, d'abord en rampant, puis grâce à la marche quadrupède.
- La **3<sup>ème</sup> phase** débute vers le 15<sup>ème</sup> jour et dure jusqu'au sevrage, à 21 jours. Le jeune est rarement dans le nid et passe son temps à explorer ou à jouer avec ses frères et sœurs. Il commence à ingurgiter de la nourriture solide à partir du 18<sup>ème</sup> jour postnatal. Le répertoire comportemental s'accroît de façon importante jusqu'à ressembler à celui des adultes aux alentours du 21<sup>ème</sup> jour. A cette date, on considère que les ratons ont achevé leur développement neurosensoriel.

Dans le cadre de notre travail, l'obstruction nasale est induite le 8<sup>ème</sup> jour postnatal et l'étude se poursuit jusqu'au sevrage, à 21 jours.

En effet, les trois premières semaines postnatales constituent une période sensible pour le développement cérébral du raton et notamment pour le développement du système olfactif (Meisami et Safari, 1981). Ce choix nous permet donc d'appréhender les grandes phases du développement neuro-comportemental du jeune. Nous pouvons ainsi caractériser certains paramètres physiologiques et comportementaux avant (9<sup>ème</sup> jour postnatal) et après (15<sup>ème</sup> jour postnatal) l'acquisition de l'audition et de la vision.



**Figure 5.** Évolution des relations mère - jeunes et développement neurosensoriel du rat au cours de la période postnatale. Les relations mères - jeunes peuvent être divisées en trois phases successives : au cours de la phase néonatale, les activités du nouveau-né sont essentiellement alimentaires, les allaitements sont initiés par la mère. Au cours de la 2<sup>ème</sup> phase, les jeunes acquièrent l'audition (J10), la locomotion quadrupède (J12), la vision (J14) et l'homéothermie (J15). Le comportement exploratoire évolue en parallèle. Au cours de la 3<sup>ème</sup> phase, les jeunes initient la majorité des événements alimentaires. Ils commencent à ingurgiter de la nourriture solide à partir du 18<sup>ème</sup> jour postnatal. Le répertoire comportemental s'accroît de façon importante jusqu'à ressembler à celui des adultes aux alentours du 21<sup>ème</sup> jour postnatal. D'après Lee et Williams, 1977.

De plus, l'induction d'une obstruction nasale au cours des premiers jours de vie se traduit par un taux de mortalité excessif chez les animaux expérimentaux. Le choix du 8<sup>ème</sup> jour comme point de départ de l'étude se justifie donc non seulement par des arguments scientifiques, mais également en fonction de critères éthiques et pratiques.

## 2.2 Élevage

Le travail expérimental est effectué sur 75 portées nées et élevées au laboratoire. L'élevage s'effectue à une température de  $22 \pm 1^\circ\text{C}$  selon une photopériode de 12h de lumière et 12h d'obscurité (photophase : 20.00h - 08.00h). Les rats, nourris et abreuvés *ad libitum*, sont maintenus dans des cages d'élevage standards (40 x 25 x 15 cm) jusqu'au sevrage à 21 jours. La litière des cages est remplacée par de la sciure propre tous les trois jours.

Une procédure de limitation de la taille des portées est effectuée selon les recommandations proposées par Agnish et Keller (1997) : le 4<sup>ème</sup> jour postnatal, les portées sont réduites à 10 jeunes (si possible 5 mâles et 5 femelles choisis de façon aléatoire) afin de garantir l'accès aux mamelles.

L'élevage des animaux et l'ensemble des expériences sont réalisés conformément aux directives du Conseil de la Communauté Européenne pour le Traitement Ethique des Animaux (n° 86/609/EEC). Tous les efforts ont été faits afin de minimiser la souffrance des individus.

## 2.3 Anesthésie

La plupart des méthodes utilisées communément pour anesthésier les rongeurs nouveau-nés sont mal adaptées et sont associées à un taux de mortalité excessif. Ainsi, Danneman et Mandrell (1997), comparant différentes techniques d'anesthésie (kétamine, pentobarbital, combinaison fentanyl-dropéridol, méthoxyflurane et hypothermie), ont montré que la méthode par hypothermie était l'une des moins invasives et était particulièrement indiquée pour les anesthésies de courte durée chez les rongeurs nouveau-nés. De plus, il a été montré que durant l'hypothermie, la température corporelle de l'animal restait bien en dessous du niveau nécessaire pour produire une analgésie physiologique (Phifer et Terry, 1986).

C'est pourquoi, dans le cadre de ce travail, l'anesthésie des jeunes rats est réalisée par induction d'une hypothermie. Pour ce faire, l'ensemble de la portée est placée pendant 10 min au congélateur à  $-18^\circ\text{C}$ . Les jeunes sont maintenus en présence de sciure du nid afin d'éviter le contact direct entre la source réfrigérante et la peau des animaux.

## 2.4 Constitution des lots expérimentaux

Au cours du 8<sup>ème</sup> jour postnatal (J8), les portées sont réparties aléatoirement en trois lots expérimentaux (figure 6) :

- **Groupe obstruction nasale (ON)** : Les animaux anesthésiés sont soumis à une cautérisation bilatérale des narines externes selon le protocole de Meisami (1976). Il s'agit de la procédure la plus simple et la plus utilisée pour produire une obstruction nasale réversible chez des animaux en croissance. Les narines sont brûlées à l'aide d'un instrument de cautérisation chirurgical (1 mm de diamètre) puis une pommade antiseptique (Auréomycine Evans 3%) est appliquée sur la brûlure de façon à proscrire tout risque d'infection. Au cours de la cicatrisation, une fine membrane se forme et occlue l'orifice de la narine empêchant ainsi le flux d'air de passer.
- **Groupe contrôle (C)** : les rats anesthésiés sont brûlés en plaçant l'instrument de cautérisation 1-2 mm au dessus de chaque narine. Ce groupe expérimental est constitué afin de caractériser le traumatisme potentiel engendré par l'anesthésie et la cautérisation.
- **Groupe témoin (T)** : les jeunes ne subissent aucune manipulation excepté celles nécessaires à la maintenance de l'élevage.

Après ces différentes opérations, les portées contrôle et obstruction nasale sont réchauffées à 37°C pendant 30 min, puis rendues à leurs mères respectives. Les variables impliquées dans les traitements expérimentaux sont récapitulées dans le tableau 3. Afin d'éviter des interférences entre les différentes expériences, les portées sont aléatoirement réparties entre les portées utilisées :

- Pour les tests comportementaux ( $n = 15$  rats / groupe / âge / sexe).
- Pour le prélèvement des extraits biologiques ( $n = 8$  rats / groupe / âge / sexe).
- Pour les tests nécessitant un examen quotidien ou l'individualisation des jeunes ( $n = 20$  rats / groupe / âge / sexe).

## 2.5 Prélèvements des extraits biologiques

Des jeunes âgés de 9, 15 ou 21 jours sont sacrifiés, pesés puis disséqués rapidement ( $n = 8$  rats / groupe / âge / sexe). Afin de limiter le nombre d'animaux sacrifiés, différents extraits biologiques sont prélevés sur chacun des individus :

- 500 µl de **sang** sont prélevés par ponction intracardiaque. Tous les prélèvements sont effectués sous héparine (0,2 g d'héparine par litre de solution NaCl à 9 ‰). Le sang est centrifugé (15 min à 650 g), le plasma est prélevé puis congelé à -18°C jusqu'à la réalisation des dosages hormonaux (cf. chapitre 5).

Groupe \ Âge	J9	J15	J21
<b>Obstruction nasale</b>			
<b>Contrôle</b>			
<b>Témoin</b>			

**Figure 6.** Lots obstruction nasale, contrôle et témoin à 9, 15 et 21 jours. J : jour postnatal. L'obstruction nasale se traduit par la mise en place d'une respiration buccale qui perdure jusqu'à la réouverture des narines externes. Les ratons contrôles sont brûlés 1 à 2 mm au dessus de chaque narine afin de caractériser l'impact éventuel de la procédure associée à l'obstruction des narines. Les jeunes témoins ne subissent aucune manipulation. *Photographies réalisées au laboratoire.*

	<b>hypothermie</b>	<b>cautérisation / obstruction</b>	<b>réchauffement</b>	<b>séparation maternelle</b>
	10 min	5 min (portée entière)	30 min	= 45 min
<b>ON</b>	+	+	+	+
<b>C</b>	+	+	-	+
<b>T</b>	-	-	-	-

**Tableau 3.** Tableau récapitulatif des variables impliquées dans les traitements expérimentaux. ON : groupe obstruction nasale, C : groupe contrôle, T : groupe témoin.

- Le **contenu de l'estomac** (cf. chapitre 5).
- Les **bulbes olfactifs** (cf. chapitre 3), les **glandes surrénales**, le **thymus** et la **rate** (cf. chapitre 5).
- Le **diaphragme** et trois **muscles oro-faciaux** : le *levator nasolabialis*, le masséter superficiel et le digastrique antérieur (cf. chapitre 5).

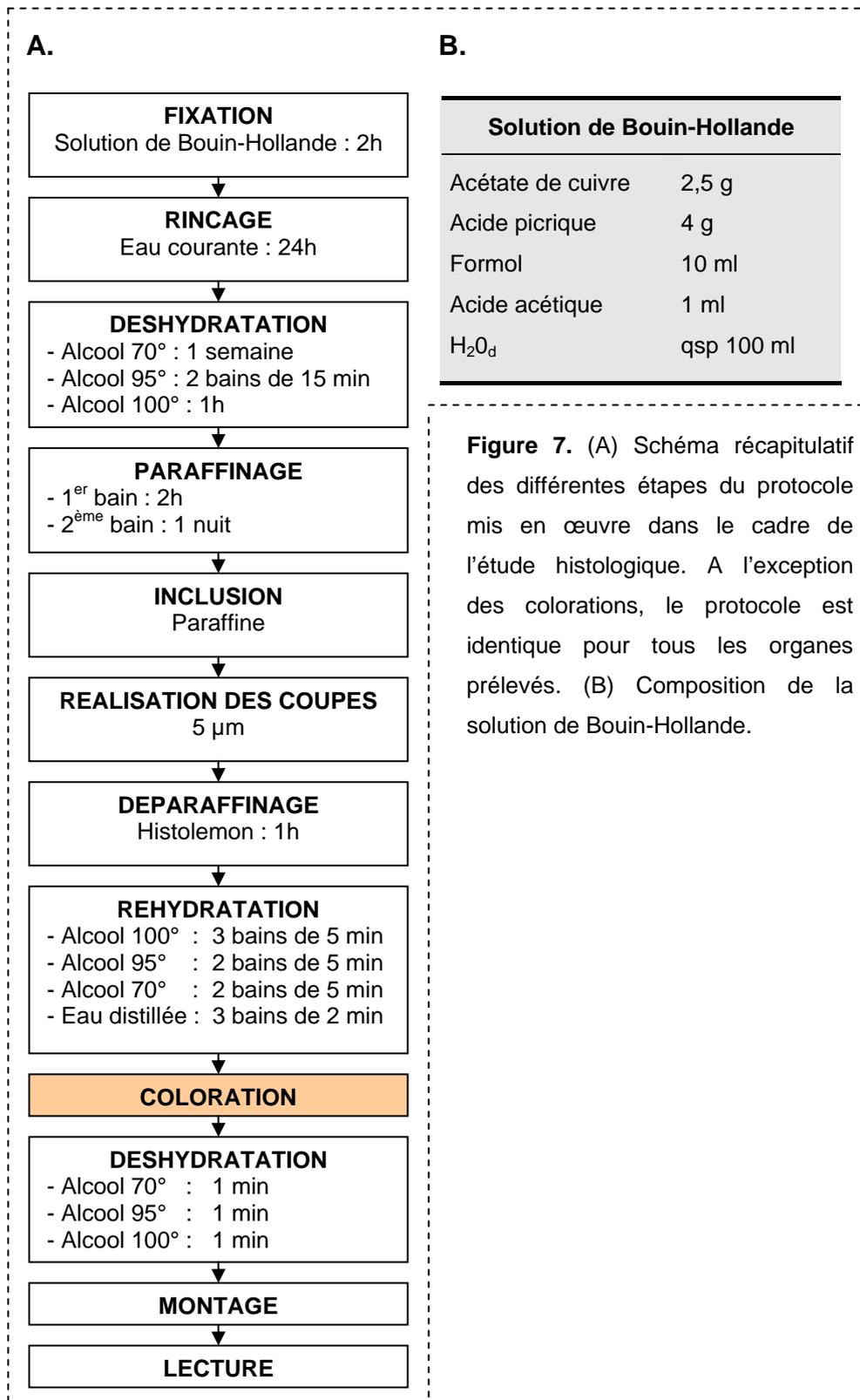
Tous les organes sont pesés et les masses mesurées sont rapportées à la masse pondérale de l'individu afin d'étudier, sur une même échelle de comparaison, le développement des organes dans les différents lots expérimentaux.

## 2.6 Étude histologique

Les bulbes olfactifs, les glandes surrénales et les thymus prélevés à 21 jours sont fixés pendant 2h dans une solution de Bouin-Hollande puis inclus dans des blocs de paraffine afin de réaliser une étude histologique (figure 7). Pour ce faire, les organes sont rincés à l'eau courante, puis déshydratés dans des bains d'alcool de concentrations croissantes : une semaine dans l'alcool à 70° en changeant de bain tous les jours, deux bains d'alcool à 95° puis un bain d'alcool absolu. Les organes sont ensuite plongés dans deux bains de paraffine successifs avant d'être inclus dans le cube de paraffine. Des coupes histologiques de 5 µm d'épaisseur sont réalisées au microtome automatique (Reichert-jung, Mod.1140/Autocut), mises à sécher à l'étuve à 35°C, puis conservées jusqu'à la réalisation des colorations (cf. chapitres 3 et 5).

## 2.7 Analyse statistique

Les variables étudiées suivant une distribution normale, l'analyse descriptive est réalisée en utilisant moyennes et erreurs standards comme indices de position et de dispersion. Les différences sont considérées significatives à partir de  $p < 0,05$



**Figure 7.** (A) Schéma récapitulatif des différentes étapes du protocole mis en œuvre dans le cadre de l'étude histologique. A l'exception des colorations, le protocole est identique pour tous les organes prélevés. (B) Composition de la solution de Bouin-Hollande.

# 3

## Obstruction nasale et validation de la procédure



## 3 Obstruction nasale et validation de la procédure

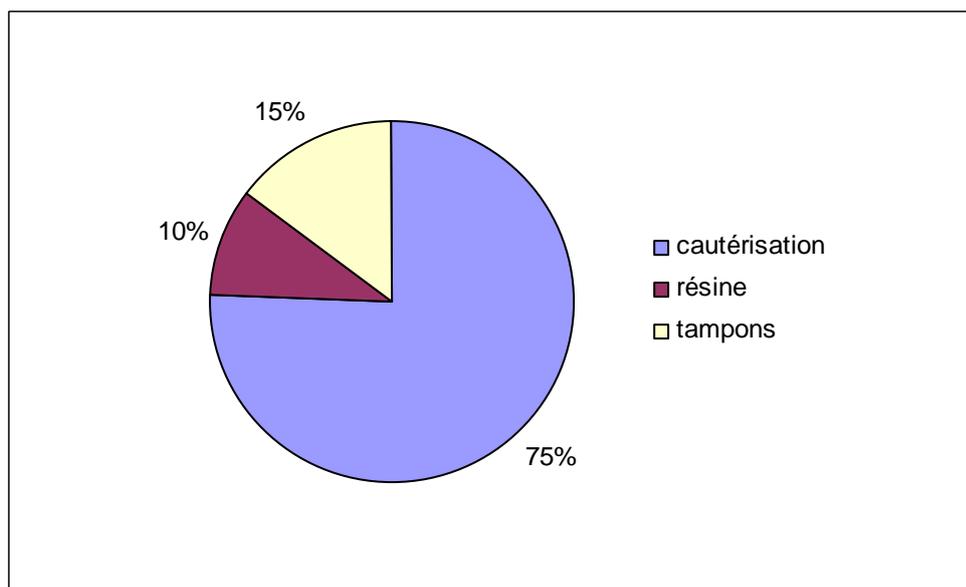
### 3.1 Introduction

Dans la littérature, différentes méthodes ont été employées en vue d'induire une obstruction nasale expérimentale. Une simple recherche à partir du serveur bibliographique "Medline" en réponse au mot clé "nasal obstruction", mot clé permettant l'investigation la plus complète, montre que la cautérisation des narines externes a été utilisée dans environ 75% des cas (figure 8). Une autre procédure consiste à bloquer les narines grâce à une résine synthétique. Cette méthode engendre une obstruction nasale définitive et a surtout été retenue pour les travaux portant sur les relations entre obstruction nasale et croissance faciale (Scarano *et al.*, 2003). La troisième technique induit une obstruction temporaire des cavités nasales *via* l'insertion d'un tampon au niveau de la narine (Kucharski et Hall, 1987). Cette méthode, qui pourrait apparaître moins invasive que les deux précédentes, a généralement été employée sur de gros animaux et semble plus difficile à mettre en œuvre sur des animaux juvéniles. En effet, la croissance rapide des individus implique le changement fréquent des tampons, et donc une séparation maternelle, avec anesthésie répétée tous les deux ou trois jours en fonction de l'espèce et de l'âge considérés (Cummings et Brunjes, 1997).

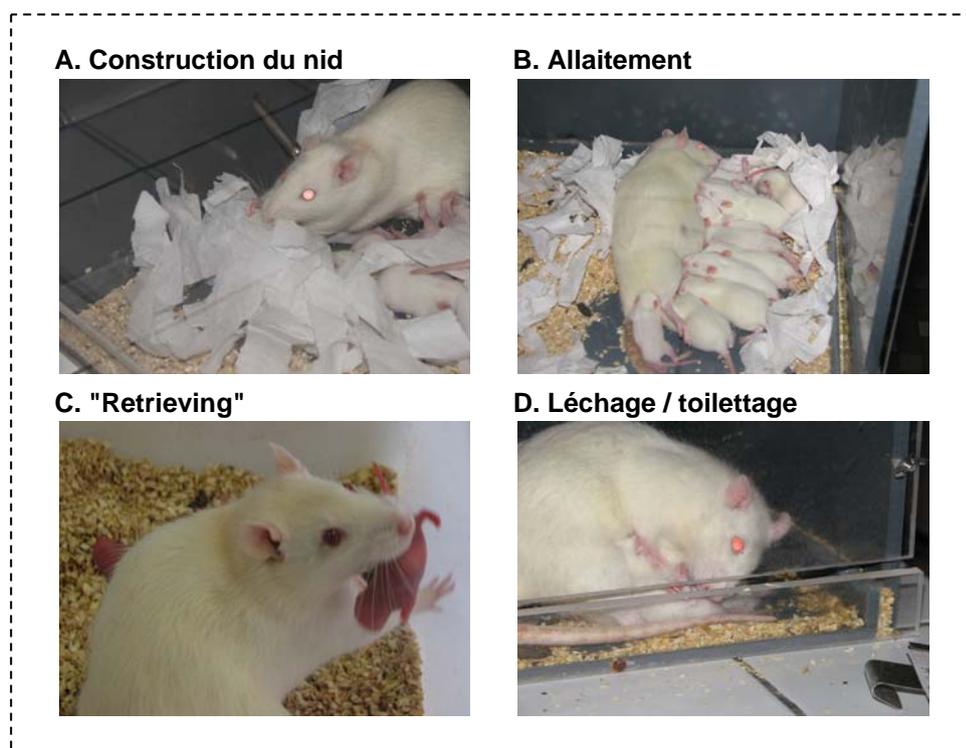
Notre choix s'est donc logiquement porté sur l'obstruction nasale par cautérisation. À part le fait que cette procédure entraîne une atrophie des éléments constitutifs du système olfactif (Najbauer et Leon, 1995; Brunjes et Shurling, 2003), il existe peu de données disponibles dans la littérature concernant les caractéristiques générales de cette méthode. Il nous a donc semblé nécessaire de préciser certains paramètres afin de faciliter l'interprétation des résultats. C'est pourquoi, le premier objectif du travail présenté dans cette partie est de valider la méthode d'obstruction par cautérisation bilatérale en vérifiant :

- *La durée de l'obstruction nasale engendrée par la cautérisation des narines.*
- *Son impact sur le développement des bulbes olfactifs.*
- *Le taux de mortalité des animaux exposés à l'obstruction nasale.*

Par ailleurs, la mère est susceptible de percevoir le stress de ses jeunes (engendrées par l'obstruction nasale ou l'anesthésie) et modifier son comportement maternel. Chez le rat, le comportement maternel se compose de quatre activités principales : la construction du nid, l'allaitement, la récupération des jeunes sortis du nid ("retrieving") et le léchage anogénital (figure 9). Les signaux sensoriels, et notamment chimiques, jouent un rôle de



**Figure 8.** Prévalence des méthodes utilisées pour effectuer une obstruction nasale expérimentale sur des animaux de laboratoire. *D'après le serveur bibliographique "Medline" répondant au terme "nasal obstruction" (terme permettant l'investigation la plus complète). n = 42 publications (1976 - 2005).*



**Figure 9.** Principales activités maternelles chez le rat. (A) Construction du nid maternel et présence au nid. (B) Allaitement. (C) Comportement de récupération des jeunes sortis du nid ou "retrieving". (D) Léchage des régions anales et génitales externes. *Photographies réalisées au laboratoire.*

premier plan dans la coordination des interactions mère-jeunes. Chez le rat, les signaux chimiques en provenance des jeunes sont par exemple nécessaires à la reconnaissance de la progéniture (Rosenblatt and Lehrman, 1963) et au maintien de l'orientation proximale de la mère vers ses jeunes (Farrel et Alberts, 2002). Ils sont également nécessaires à l'expression de certaines activités maternelles tel que le léchage de la région ano-génitale. Cet acte est lié à la reconnaissance par la mère d'une phéromone juvénile, le dodécyl-propionate, synthétisée et libérée par la glande préputiale des rats (Brouette-Lahlou *et al.*, 1999). Le léchage ano-génital est un comportement essentiel à la survie des jeunes puisqu'en son absence, le jeune rat ne peut ni déféquer, ni uriner et meurt rapidement. Pendant le léchage ano-génital, la mère détecte l'état physiologique du jeune grâce à la concentration des phéromones sociales émises par le jeune. Or l'émission des phéromones sociales varient en fonction du stress et la variation de leur production peut entraîner chez la mère des perturbations comportementales (abandon du jeune, agression, cannibalisme). Par conséquent, le second objectif du travail expérimental présenté dans cette partie est de répondre à la question suivante :

- *Les conséquences comportementales et physiologiques de l'obstruction nasale peuvent-elles être liées à une inhibition du comportement maternel ?*

## **3.2 Matériel et méthodes expérimentales**

### 3.2.1 Suivi des portées

Du 8<sup>ème</sup> au 21<sup>ème</sup> jour post-natal, les jeunes ( $n = 20$  rats / groupe / âge / sexe) sont observés entre 09.00 h et 12.00 h afin de noter :

- La date exacte de réouverture des narines. Ce contrôle est effectué à l'aide d'une solution d'eau savonneuse. La solution est appliquée avec un coton sur les narines des animaux exposés à l'obstruction nasale. Lorsqu'il y a apparition de bulles d'air, les narines sont considérées ouvertes et l'obstruction nasale achevée.
- La mort d'un jeune afin d'évaluer le taux de mortalité dans chacun des lots expérimentaux.

### 3.2.2 Bulbes olfactifs

Les bulbes olfactifs prélevés sur les individus sont pesés et fixés, puis des coupes histologiques sont réalisées selon le protocole décrit dans le chapitre "modèle expérimental et méthodes générales" (p.36).

Les bulbes olfactifs sont colorés au violet de crésyl. Ce colorant permet de visualiser les corps cellulaires des neurones en laissant les prolongements cytoplasmiques incolores. Les noyaux apparaissent en bleu-violet. Le violet de crésyl permet donc de distinguer les différentes couches du bulbe olfactif sans avoir à réaliser de coloration de fond. Les bulbes olfactifs se caractérisent en effet par la présence de couches concentriques alternant la présence et l'absence de corps cellulaires. Les bulbes olfactifs des individus témoins, contrôles et obstruction nasale sont colorés selon le protocole suivant :

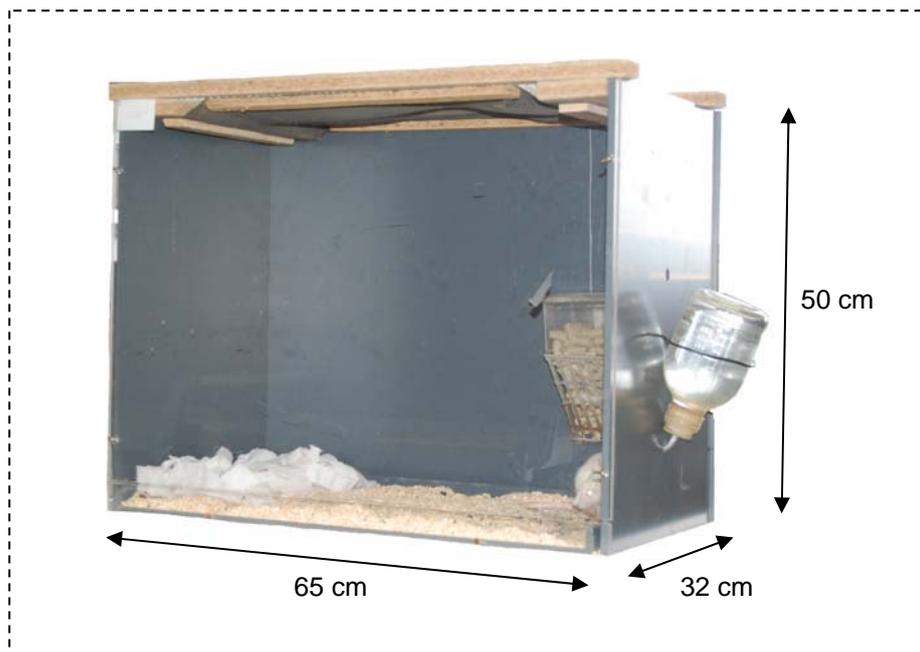
- Déparaffinage à l'Histolemon (Carlo Erba Réactifs, France) pendant 1h
- Réhydratation dans des bains d'alcool de concentrations décroissantes : trois bains d'alcool à 100° (5 min par bain), deux bains d'alcool à 95° (5 min par bain), deux bains d'alcool à 70° (5 min par bain) puis trois bains d'eau distillée (2 min par bain).
- Coloration au violet de crésyl acétate (0,5% de violet de crésyl et 0,1% d'acide acétique en solution aqueuse) pendant 15 min.
- Rinçage à l'eau courante pendant 1 min
- Déshydratation dans des bains d'alcool de concentrations croissantes (70, 95 puis 100°, 1min par bain)
- Montage (Clearium Mountant, Surgipath europe LTD)

Ces coupes sont finalement photographiées, puis les surfaces relatives des différentes couches du bulbe olfactif sont calculées à l'aide d'un logiciel d'analyse d'images (ImageJ 1.38x, Wayne Rasband, National Institute of Health, USA, disponible sur <http://rsb.info.nih.gov/ij/>). Afin d'augmenter la précision des mesures, trois coupes par lames (3 à 5 lames par individus) sont utilisées pour l'analyse. Les surfaces des couches glomérulaire et plexiforme externe sont mesurées individuellement. La couche des cellules mitrales, la couche plexiforme interne et la couche des cellules granulaires sont groupées conformément aux travaux de Cummings et Brunjes (1997).

### 3.2.3 Comportement maternel

Toutes les observations comportementales sont effectuées durant la phase nocturne entre 09.00 h et 12.00 h. Le dispositif est maintenu dans la même position tout au long de l'étude.

Au cours de la dernière semaine de gestation, les mères *pre-partum* sont placées dans des cages expérimentales (65 x 32 x 50 cm) conçues pour faciliter les observations comportementales (figure 10). La partie supérieure du dispositif est recouverte par un grillage gainé de plastique afin d'éviter l'oxydation, la paroi antérieure est en plexiglas transparent et les trois autres parois sont en PVC de couleur grise. Le sol (0,2 m<sup>2</sup>) est



**Figure 10.** Dispositif expérimental utilisé pour tester le comportement maternel. La paroi antérieure est en plexiglas transparent afin de faciliter les observations comportementales. Les trois autres parois sont en PVC de couleur grise. Le sol est recouvert par de la sciure propre et du papier est mis à la disposition de la mère pour la construction du nid. Les animaux sont nourris et abreuvés *ad libitum*. Photographie réalisée au laboratoire.

recouvert par  $100 \pm 10$ g de sciure propre auxquels s'ajoutent  $6,0 \pm 0,1$  g de papier mis à la disposition de la mère pour la construction du nid. Les animaux sont nourris et abreuvés *ad libitum* durant toute la durée de l'étude et la litière des cages est remplacée par de la sciure propre une fois par semaine. Cinq portées par âge et par groupe sont utilisées pour tester le comportement maternel.

L'évaluation du comportement maternel est basée sur le protocole établi précédemment par Arrati *et al.* (2005) :

Dans un premier temps, la mère est retiré du dispositif pendant 2 h (de 09.00 h à 11.00 h) afin d'exacerber le comportement maternel au moment de la période d'observation. À la fin de cette période de séparation, le nid est défait et le matériel servant à sa construction est réparti aléatoirement dans la cage expérimentale. Sur les 10 jeunes que comprend la portée, seuls trois femelles et trois mâles sont remis en présence de la mère. Cette limitation temporaire de la taille des portées vise à éluder les problèmes de compétition au sein de la portée. Les jeunes retirés du dispositif sont maintenus en présence de sciure du nid et leur région ano-génitale est frottée périodiquement afin de limiter l'impact de cette séparation maternelle additionnelle (Van Oers *et al.*, 1999).

À 11.00 h, les jeunes sont dispersés du côté opposé à l'emplacement du nid maternel et la mère est remise dans le dispositif. Le comportement maternel est observé en continu de 11.00 h à 12.00 h. Ces observations sont effectuées à J9 uniquement. En effet, avec la maturation neuro-comportementale de la progéniture, l'expression du comportement maternel diminue progressivement au cours de la période postnatale. Différents paramètres sont pris en compte :

- Le temps mis pour ramener l'ensemble de la portée au nid ou "retrieving".
- Le temps total passé à lécher/toiletter les jeunes.
- Le temps total de présence au nid.

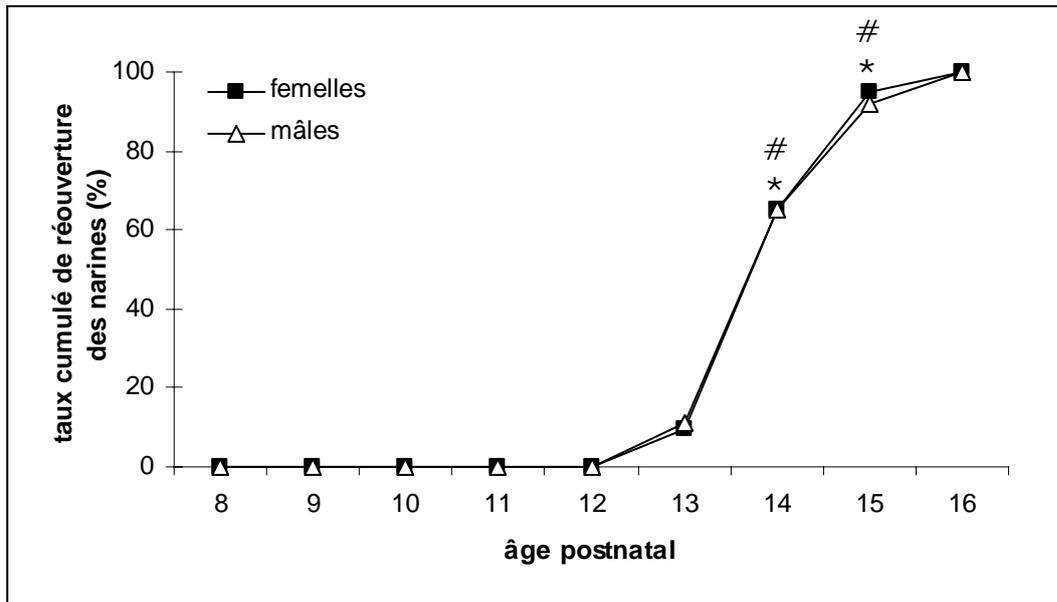
À la fin de l'heure d'observation, la qualité du nid est en outre évaluée selon les critères définis par Mann (1993) :

0 → pas de nid

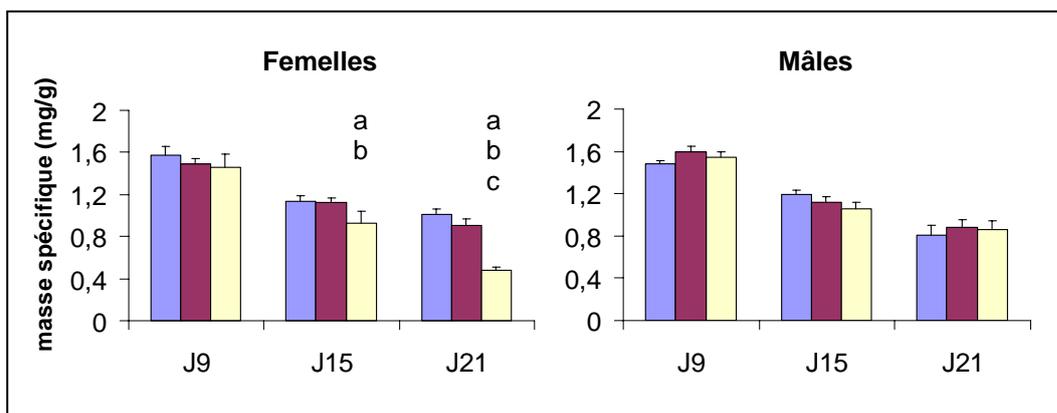
1 → présence d'un nid rudimentaire

2 → présence de murs autour de la portée

3 → présence d'un nid élaboré, construit avec tout le matériel disponible



**Figure 11.** Taux cumulé de réouverture des narines chez les animaux exposés à l'obstruction nasale.  $n = 20$  rats / âge et / sexe. #, significativement différent de l'âge précédent chez les femelles; \*, significativement différent de l'âge précédent chez les mâles. Analyse du  $X^2$  de Mac Nemar (échantillons appariés), J13 à J14 :  $X^2 = 10,17$ ;  $p = 0,001$  chez les femelles;  $X^2 = 15,71$ ;  $p = 0,0001$  chez les mâles. J14 à J15 :  $X^2 = 7,56$ ;  $p = 0,004$  chez les femelles;  $X^2 = 8,65$ ;  $p = 0,003$  chez les mâles.



**Figure 12.** Masse spécifique des bulbes olfactifs à 9, 15 et 21 jours chez les animaux témoins (■), contrôles (■) et obstruction nasale (■).  $m \pm SEM$ .  $n = 8$  rats / groupe / âge / sexe. J : jour postnatal. Analyse de l'ANOVA à 2 facteurs (effet traitement), J15 :  $F = 5,00$  à 2 degrés de liberté,  $p = 0,011$ ; J21 :  $F = 8,33$  à 2 degrés de liberté,  $p = 0,001$ . Analyse du PLSD de Fisher, <sup>a</sup>  $p < 0,05$  comparé aux témoins; <sup>b</sup>  $p < 0,05$  comparé aux contrôles; <sup>c</sup>  $p < 0,05$  comparé aux homologues mâles.

### 3.2.4 Analyses statistiques

Pour le taux de mortalité et le taux de réouverture des narines, la comparaison entre les sexes est effectuée par le test du chi-2 pour échantillons indépendants et l'évolution au cours de la période d'observation est analysée par le test du chi-2 de Mc Nemar pour échantillons appariés. Pour la masse des bulbes olfactifs, les résultats sont analysés par une ANOVA à deux facteurs (sexe \* traitement) suivie du test PLSD de Fischer pour comparer les moyennes spécifiques de chaque groupe expérimental. En ce qui concerne les données comportementales, le comportement maternel est analysé par le test non paramétrique de Kruskal-Wallis suivi du test U de Mann-Whitney a posteriori. Les effectifs sont en effet trop faibles pour pouvoir utiliser des tests statistiques paramétriques.

## 3.3 Résultats

### 3.3.1 Obstruction nasale et réouverture des narines

Le taux de réouverture des narines est présenté sous forme cumulée dans la figure 11. Celle-ci montre que les narines commencent à s'ouvrir de façon significative à partir du 14<sup>ème</sup> jour postnatal, soit six jours après le traitement expérimental (comparativement à J13 :  $\chi^2 = 10,17$ ;  $p = 0,001$  chez les femelles et  $\chi^2 = 15,71$ ;  $p = 0,0001$  chez les mâles). Le 15<sup>ème</sup> jour postnatal, 95% des narines sont ouvertes chez les femelles ( $\chi^2 = 7,56$ ;  $p = 0,004$  comparé à J14) alors qu'il y a 92% de narines ouvertes chez les mâles ( $\chi^2 = 8,65$ ;  $p = 0,003$  comparé à J14). L'ouverture des narines s'achève à J16, c'est-à-dire huit jours après l'induction de l'obstruction nasale.

Quel que soit l'âge considéré, il n'y a aucune différence significative entre les femelles et les mâles exposés à l'obstruction nasale ( $0,01 < \chi^2 < 0,06$ ;  $0,810 < p < 0,999$ ).

### 3.3.2 Obstruction nasale et développement des bulbes olfactifs

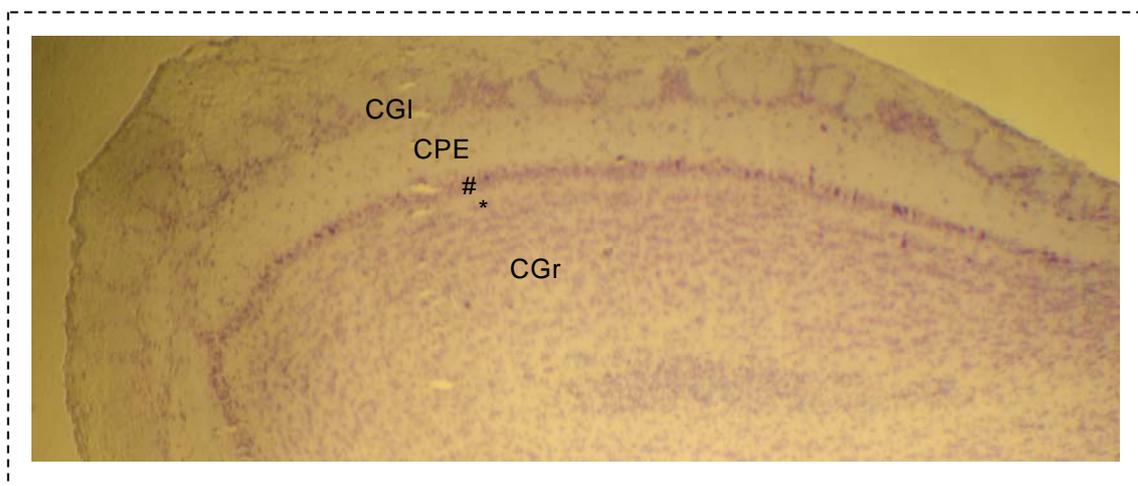
**Masse spécifique.** La figure 12 montre que les traitements expérimentaux ont un impact sur la masse spécifique des bulbes olfactifs à partir du 15<sup>ème</sup> jour postnatal ( $F = 5,00$ ;  $p = 0,011$ ). Cet effet se maintient jusqu'au 21<sup>ème</sup> jour ( $F = 8,19$ ;  $p = 0,001$ ). À cet âge, on observe un effet additionnel du sexe des individus sur la masse des bulbes olfactifs (effet sexe \* traitement :  $F = 8,33$ ;  $p = 0,0009$ ).

Ainsi, 24h après le traitement, la masse spécifique des bulbes olfactifs n'est pas modifiée par l'obstruction nasale ( $F = 0,22$ ;  $p = 0,808$ ). À J15, les femelles exposées à l'obstruction nasale présentent une atrophie des bulbes olfactifs (-18% et  $p = 0,018$  vs témoins; -17%

et  $p = 0,029$  vs contrôles). Cette différence subsiste jusqu'à 21 jours malgré la réouverture des narines (-52% et  $p < 0,0001$  vs témoins; -47% et  $p < 0,0001$  vs contrôles). À cet âge, les femelles exposées à l'obstruction nasale présentent une masse des bulbes olfactifs significativement plus faible que leurs homologues mâles (-44% et  $p = 0,002$ ).

Il n'existe par ailleurs aucune différence significative entre les mâles des différents lots expérimentaux que ce soit à 15 jours ( $p = 0,098$  vs témoins;  $p = 0,536$  vs contrôles) ou à 21 jours ( $p = 0,925$  vs témoins;  $p = 0,738$  vs contrôles). Enfin, les bulbes olfactifs témoins et contrôles arborent une masse spécifique comparable indépendamment de l'âge ou du sexe des individus ( $0,272 < p < 0,838$ ).

**Histologie.** Un exemple de coloration au violet de crésyl est présenté dans la figure 13 (ci-dessous). Les résultats de l'analyse sont présentés dans le tableau 4. Celui-ci montre qu'en termes de surface relative, la couche des cellules granulaires est la plus importante (52-62%), suivie de la couche plexiforme externe (22-25%) et de la couche glomérulaire (17-23%). La couche granulaire semble avoir une surface relative supérieure chez les femelles exposés à l'obstruction nasale comparé aux femelles témoins et contrôles. Cette différence, moins prononcée chez les mâles, se fait au détriment de la couche glomérulaire et de la couche plexiforme externe.



**Figure 13.** Exemple de coloration d'un bulbe olfactif au violet de crésyl chez une femelle contrôle de 21 jours (grossissement : 10 x 2,5). CGI : couche glomérulaire, CPE : couche plexiforme externe, CGr : couche des cellules granulaires. Les surfaces des couches mitrales (#) et plexiforme interne (\*) sont mesurées avec celle des cellules granulaires.

		Surface relative (%) des couches :		
		Glomérulaire	Plexiforme externe	Granulaire
Femelles	T	22,9 ± 1,9	24,9 ± 0,5	52,2 ± 2,3
	C	22,0 ± 0,2	23,4 ± 0,5	54,6 ± 0,3
	ON	18,7 ± 0,3	21,9 ± 1,5	59,4 ± 1,8
Mâles	T	17,5 ± 1,0	22,7 ± 0,4	59,8 ± 0,6
	C	17,7 ± 1,6	22,3 ± 0,2	60,0 ± 1,8
	ON	16,8 ± 1,4	21,6 ± 0,5	61,6 ± 0,9

**Tableau 4.** Surface relative (%) des différentes couches du bulbe olfactif chez les animaux témoins (T), contrôles (C) et obstruction nasale (ON) de 21 jours. Les couches mitrale et plexiforme interne sont incluses dans les mesures de la couche granulaire.  $m \pm SEM$ .  $n = 3$  bulbes olfactifs / groupe / sexe. Aucun test statistique n'a pu être réalisé du fait des effectifs trop faibles.

### 3.3.3 Obstruction nasale et taux de mortalité

Le taux de mortalité est présenté sous forme cumulée dans la figure 14. La majorité des jeunes meurent le 11<sup>ème</sup> jour postnatal, soit 72h après la cautérisation des narines (comparativement à J10 :  $\chi^2 = 12,39$ ;  $p = 0,0003$  chez les femelles et  $\chi^2 = 10,00$ ;  $p = 0,0009$  chez les mâles). À cet âge, le taux de mortalité cumulé est de 26% chez les femelles et de 21% chez les mâles. La mortalité augmente ensuite progressivement jusqu'au 14<sup>ème</sup> jour postnatal avant de se stabiliser. Le 21<sup>ème</sup> jour postnatal, le taux de mortalité cumulé est de 38% chez les femelles et de 36% chez les mâles. Quel que soit l'âge considéré, il n'y a aucune différence significative entre les femelles et les mâles exposés à l'obstruction nasale ( $0,01 < \chi^2 < 0,38$ ;  $0,537 < p < 0,999$ ). À noter qu'aucune mortalité n'a été observé dans les portées témoins et contrôles au cours de la période d'observation (de J8 à J21).

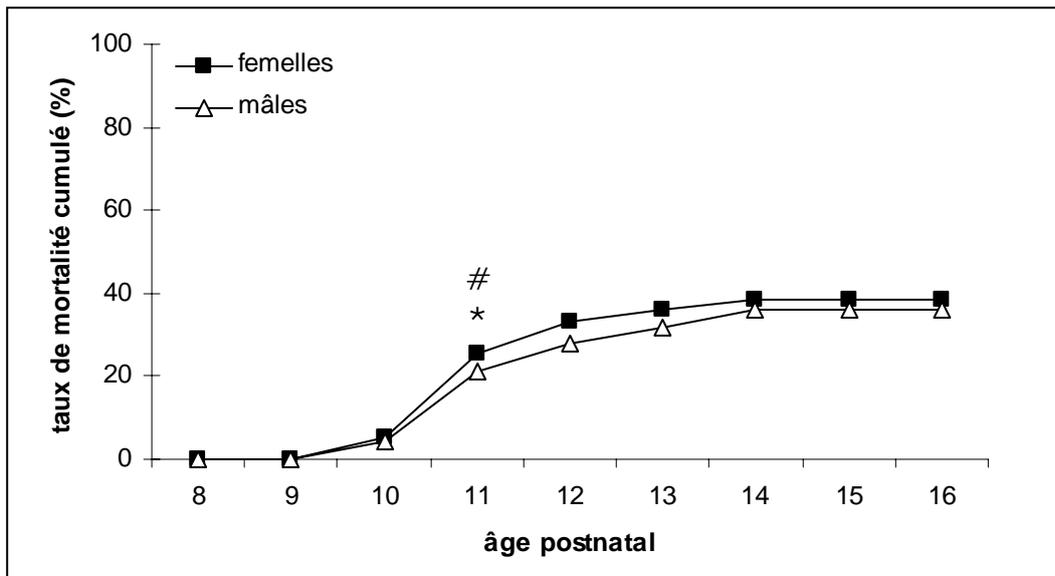
### 3.3.4 Obstruction nasale et comportement maternel

La figure 15 montre qu'au 9<sup>ème</sup> jour postnatal, le comportement maternel est affecté par les traitements expérimentaux. Il y a effectivement des différences significatives en ce qui concerne la durée du "retrieving" ( $H = 8,64$ ;  $p = 0,013$ ) et le temps passé à lécher/toiletter les jeunes ( $H = 8,18$ ;  $p = 0,017$ ). En revanche, le temps de présence au nid ( $H = 0,56$ ;  $p = 0,756$ ) et la qualité du nid ( $H = 1,18$ ;  $p = 0,555$ ) sont comparables entre les différents lots expérimentaux.

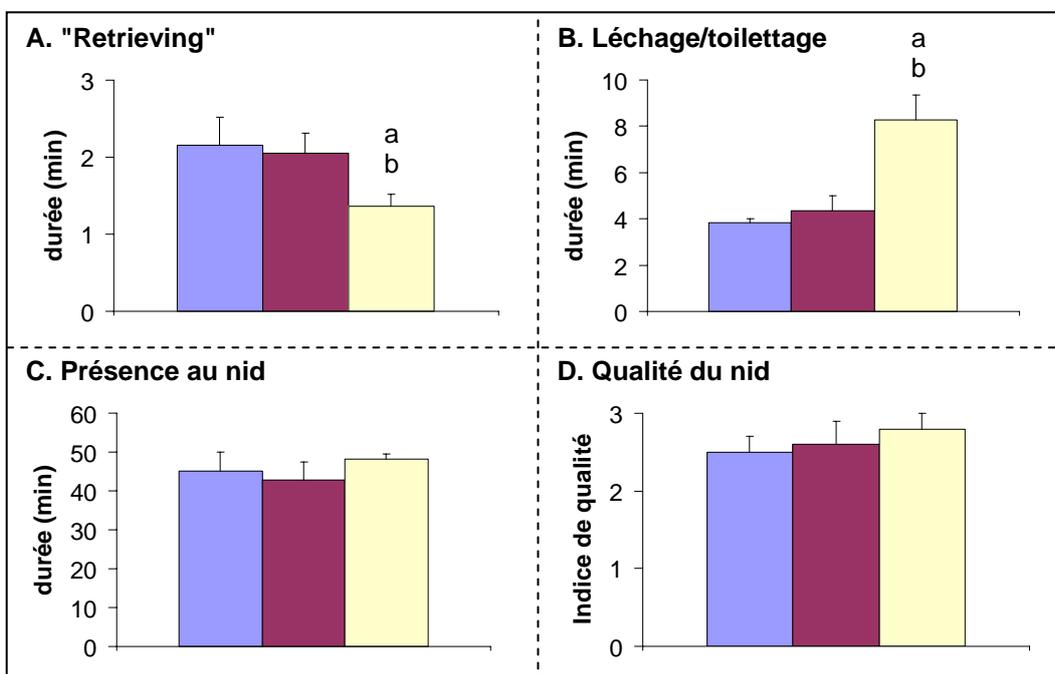
Ainsi, les mères des portées exposées à l'obstruction nasale mettent moins de temps à ramener les jeunes dans le nid comparées aux mères témoins ( $p = 0,009$ ) et contrôles ( $p = 0,016$ ). De plus, la durée du léchage/toilettage est supérieure dans les portées exposées à l'obstruction nasale ( $p = 0,009$  vs témoins;  $p = 0,028$  vs contrôles). Il n'y a par ailleurs aucune différence significative entre les groupes témoins et contrôles ( $p = 0,917$  pour le "retrieving";  $p = 0,602$  pour le léchage/toilettage).

## 3.4 Discussion

La procédure de cautérisation des narines induit une obstruction nasale complète du 8<sup>ème</sup> au 13<sup>ème</sup> jour postnatal. Les narines s'ouvrent ensuite de façon significative au cours des 14<sup>ème</sup> et 15<sup>ème</sup> jours postnatals. Le choix des 9<sup>ème</sup>, 15<sup>ème</sup> et 21<sup>ème</sup> jours postnatals comme âges expérimentaux nous permet donc d'évaluer les impacts de l'obstruction nasale 24h après le traitement (J9), à la fin de la période d'obstruction nasale (J15) et six jours après la réouverture des narines (J21).



**Figure 14.** Taux de mortalité cumulé chez les animaux exposés à l'obstruction nasale.  $n = 20$  rats / âge / sexe. #, significativement différent de l'âge précédent chez les femelles; \*, significativement différent de l'âge précédent chez les mâles. Analyse du  $\chi^2$  de Mac Nemar (échantillons appariés), J10 à J11,  $\chi^2 = 12,39$ ;  $p = 0,0003$  chez les femelles;  $\chi^2 = 10,00$ ;  $p = 0,0009$  chez les mâles.



**Figure 15.** Comportement maternel dans les portées témoins (■), contrôles (■) et obstruction nasale (■) de 9 jours. (A) Temps mis pour ramener les jeunes au sein du nid, (B) temps total passé à lécher/toilettier les jeunes, (C) durée de présence au nid et (D) indice de qualité du nid.  $n = 5$  portées / groupe. Analyse du Kruskal-Wallis, retrieving :  $H = 8,64$  et  $p = 0,013$ ; léchage/toilettage :  $H = 8,18$  et  $p = 0,017$ . Analyse du Mann-Whitney, <sup>a</sup>  $p < 0,05$  comparé aux portées témoins; <sup>b</sup>  $p < 0,05$  comparé aux portées contrôles.

Nos résultats montrent par ailleurs que l'obstruction nasale entraîne une atrophie des bulbes olfactifs touchant uniquement les femelles à partir du 15<sup>ème</sup> jour postnatal. Cette atrophie tend à s'accroître entre le 15<sup>ème</sup> et le 21<sup>ème</sup> jour malgré la réouverture des narines. À la fin de la période d'observation, les femelles exposées à l'obstruction nasale présentent une masse spécifique des bulbes olfactifs significativement plus faible que celle de leurs homologues mâles. Il est bien établi que l'induction d'une obstruction nasale entraîne une atrophie des éléments constitutifs du système olfactif. Cette atrophie a été démontrée non seulement pour la muqueuse olfactive, mais également pour le bulbe olfactif (Najbauer et Leon, 1995; Brunjes et Shurling, 2003). En effet, en l'absence de stimulation sensorielle, on constate une diminution du nombre de cellules au sein de la muqueuse olfactive, le manque d'afférence en provenance de la muqueuse entraîne à son tour une baisse du nombre de cellules au sein du bulbe olfactif. Deux hypothèses non exclusives peuvent être avancées pour expliquer ces modifications : une diminution de la néoneurogenèse et/ou une augmentation de l'apoptose (Farbman *et al.*, 1988; Bauer *et al.*, 2003; Wu *et al.*, 2003).

Nos données révèlent que l'atrophie des bulbes olfactifs concerne uniquement les femelles, résultat qui pourrait être expliqué par les niveaux élevés de testostérone présents chez les mâles au cours du développement postnatal. En effet, la testostérone est connue pour exercer une action préventive sur l'apoptose neuronale (Nordeen *et al.*, 1985; Hammond *et al.*, 2001) et pour induire un taux de néoneurogenèse supérieur dans les structures cérébrales sexuellement dimorphiques comme le bulbe olfactif accessoire (Peretto *et al.*, 2001). De façon surprenante, bien que les narines soient ouvertes à J16, l'atrophie des bulbes olfactifs s'accroît chez les femelles entre le 15<sup>ème</sup> et le 21<sup>ème</sup> jour postnatal. Mirich et Brunjes (2001) et Cummings *et al.* (1997) ont montré que suite à 20 jours d'obstruction nasale réalisée à partir de la naissance, le retour à une respiration normale entraînait une restauration de l'épaisseur de la muqueuse olfactive en cinq jours et que les bulbes olfactifs retrouvaient une taille normale après quarante jours. Ce délai de récupération pourrait expliquer le fait que les bulbes olfactifs restent atrophiés dans les jours qui suivent la réouverture des narines.

L'accentuation de l'atrophie pourrait néanmoins impliquer d'autres facteurs tels que la persévérance de modifications hormonales. En effet, des récepteurs aux glucocorticoïdes et aux hormones thyroïdiennes sont présents sur les cellules du bulbe olfactif dès les stades précoces de développement (Morimoto *et al.*, 1996; Galeeva *et al.*, 2002). Ainsi, Van Den Hove *et al.* (2006) ont récemment montré que le stress prénatal avait un impact délétère sur la prolifération cellulaire néonatale au sein du bulbe olfactif. De plus, les hormones thyroïdiennes sont essentielles à la croissance et à la maturation du système

nerveux central (Koibuchi et Chin, 2000). L'hypothyroïdisme postnatal entraîne notamment une baisse de la prolifération, non seulement au sein de l'épithélium olfactif, mais également au niveau des bulbes olfactifs (Paternostro et Meisami, 1991; Hoyk *et al.*, 1996). Les glucocorticoïdes et les hormones thyroïdiennes pourraient donc jouer un rôle important dans le développement des bulbes olfactifs suite à l'induction de l'obstruction nasale bilatérale.

Par ailleurs, les animaux exposés à l'obstruction nasale présente un taux de mortalité élevé qui survient essentiellement à J11, c'est-à-dire 72h après la cautérisation des narines. Le taux de mortalité augmente progressivement jusqu'à J14 avant de se stabiliser autour de 37% à partir du moment où les narines commencent à s'ouvrir. La détresse respiratoire induite par l'obstruction nasale est sans doute partiellement responsable de cet important taux de mortalité. Ainsi, le rat présente une forte résistance des voies aériennes oro-pharyngées et l'obstruction des narines se traduit donc par une acidose respiratoire aiguë (Kalogjera *et al.*, 1991). Chez le rat adulte, Erkan *et al.* (1994) rapportent une diminution du pH et de la pression partielle en O<sub>2</sub> s'aggravant au cours des 72h suivant l'occlusion des narines. Ces modifications de l'homéostasie gazeuse du sang seraient à l'origine de la mort des animaux entre 90 et 100h après l'induction de l'obstruction nasale.

D'autre part, Nakajima et Ohi (1977) ont montré que les animaux décédés suite à l'induction d'une obstruction nasale expérimentale présentaient des nécroses et des hémorragies au niveau de l'intestin grêle. Ces modifications sont liées à une accumulation excessive de gaz dans le tractus gastro-intestinal des individus. En effet, au moment de l'alimentation, l'obstruction nasale entraîne une compétition entre les processus respiratoire et alimentaire se traduisant par une aérophagie. Selon Kalogjera *et al.* (1991), le décès serait lié à cette aérophagie qui provoquerait une élévation du diaphragme et un iléus paralytique (occlusion intestinale due à une paralysie de l'intestin grêle). Ce dernier entraînerait un arrêt du transit intestinal. De plus, l'aérophagie néonatale peut être à l'origine d'une perforation gastrique létale comme cela a préalablement été montré chez le rat, le chien et l'être humain (Shaker *et al.*, 1973; Leone et Krasna, 2000). Enfin, la littérature suggère que l'obstruction nasale pourrait perturber la prise alimentaire (cf introduction générale, p.25). Une forte réduction de l'apport énergétique pourrait donc être impliquée dans la mortalité élevée des animaux exposés à l'obstruction nasale. Quoi qu'il en soit, ce taux de mortalité important ne provient pas d'une inhibition du comportement maternel qui semble, au contraire, exacerbé.

Nos résultats montrent en effet que les mères des portées exposées à l'obstruction nasale mettent moins de temps à ramener les jeunes dans le nid et passent plus de temps à lécher leur progéniture. Ces modifications nécessitent sans doute le traitement simultané de signaux visuels, acoustiques et olfactifs. Il est bien établi que les jeunes rongeurs en situation de détresse émettent des vocalisations ultrasoniques (Hofer et Shair, 1992). Il a notamment été montré que le comportement de "retrieving" est lié à ces vocalisations émises par la progéniture éloignée du nid (Hahn et Lavooy, 2005). Les appels d'isolation ultrasoniques initient ainsi les comportements de recherche et de transport par la mère. Ils raccourcissent en outre la latence de récupération des jeunes (Brewster et Leon, 1980). De plus, le nombre d'appels est susceptible de modifier le comportement de la mère (Brudzynski, 2005). Étant donné qu'un niveau élevé d'anxiété entraîne une augmentation du taux de vocalisations (Naito *et al.*, 2000), un nombre d'appels plus élevé pourrait expliquer la réduction du temps mis pour ramener les jeunes au sein du nid.

Les vocalisations ultrasoniques contribuent également à accroître le temps de léchage ano-génital suite à la récupération des jeunes (Brouette-Lahlou *et al.*, 1992), ce qui est en accord avec nos résultats. Chez le rat, la majorité du temps de toilettage est passé à lécher la région ano-génitale de la progéniture (Brouette-Lahlou *et al.*, 1991). En plus de l'influence des signaux acoustiques, le léchage ano-génital est fortement dépendant des signaux chimiques présents dans l'urine des jeunes (Brouette-Lahlou *et al.*, 1999). Ainsi, les mères pourraient percevoir les impacts de l'obstruction nasale au travers la détection de signaux chimiques présents dans l'urine de la progéniture. Des investigations complémentaires sont donc nécessaires afin de déterminer la nature des signaux par lesquels les mères perçoivent la détresse de leur progéniture.

En résumé, la procédure de cautérisation des narines entraîne six jours d'obstruction nasale complète. Cette obstruction se traduit par un fort taux de mortalité qui ne provient pas d'une inhibition du comportement maternel. Bien que les bulbes olfactifs ne soient pas atrophiés chez les mâles exposés à l'obstruction nasale, ceci ne présume en rien du développement de la muqueuse olfactive. Quoi qu'il en soit, l'obstruction nasale devrait se traduire par une hyposmie susceptible de perturber la mise en place des comportements précoces tels que l'acquisition du comportement exploratoire.

# 4

## Obstruction nasale et comportement exploratoire



## 4 Obstruction nasale et comportement exploratoire

### 4.1 Introduction

L'activité exploratrice peut être définie comme une tendance, chez tous les animaux, à se déplacer et à inspecter le milieu même quand ni la faim, ni la soif, ni l'appétit sexuel ne les y contraignent. Ce comportement s'exprime essentiellement en environnement non familier ou lorsque l'individu rencontre un objet inconnu. L'activité exploratrice décroît alors au fur et à mesure que l'environnement ou l'objet deviennent familiers. Cependant, tout changement intervenant dans un espace précédemment exploré réactive les comportements d'exploration (Poucet et Save, 2004). De nombreuses expériences montrent que l'individu réagit ainsi à des modifications des relations spatiales entre les objets de son environnement par une augmentation de son activité exploratrice (Poucet *et al.*, 1986; Thinus-Blanc *et al.*, 1987). On peut distinguer deux niveaux de comportement exploratoire :

- Lorsqu'il consiste en changement d'orientation des organes des sens et de position de l'individu, on parle de comportement exploratoire d'**orientation**.
- Lorsque la locomotion est impliquée, on parle de comportement exploratoire d'**investigation**. Celui-ci peut éventuellement impliquer une modification ou un déplacement des objets extérieurs. Le comportement exploratoire d'investigation peut être évalué en mesurant la quantité d'approches (néophilie) et/ou d'évitements (néophobie) d'un stimulus non familier (Nyberg, 2005).

Au cours de la période de développement, la mise en place du comportement exploratoire est un préliminaire indispensable à la dispersion et à l'émancipation du jeune mammifère. Ainsi, le jeune sevré doit quitter le lieu de naissance afin de coloniser un nouvel environnement, limitant ainsi le risque de compétition intra-spécifique. Il doit alors explorer cet environnement inconnu afin d'y repérer les stimuli attractifs (sources alimentaires, partenaires sexuels...) et les dangers potentiels (prédateurs...). Les rongeurs ont une grande propension à explorer les stimuli environnementaux inconnus (Lalonde, 2002). Chez le rat, le comportement exploratoire apparaît avec la marche quadrupède et la vision entre le 12<sup>ème</sup> et le 15<sup>ème</sup> jour postnatal bien qu'à cet âge, les processus de traitement de l'information spatiale soient encore immatures (Ricceri *et al.*, 2000). Ainsi, contrairement à l'adulte, le rat juvénile ne présente pas de comportement d'alternance spontanée (Egger *et al.*, 1973), test expérimental utilisé pour étudier le comportement exploratoire et la mémoire spatiale.

Le comportement exploratoire est l'un des préliminaires de l'apprentissage. Ce dernier peut être défini comme un processus d'acquisition de nouvelles connaissances ou de nouvelles compétences. Cette acquisition est à l'origine d'une nouvelle représentation de l'environnement et de changements comportementaux spécifiques et persistants. L'apprentissage est le seul processus qui permette à l'organisme de modifier son potentiel comportemental en tenant compte de ses expériences antérieures de telle manière qu'il soit en mesure d'éviter de répéter les mêmes erreurs, perfectionnant ainsi son comportement (Lassalle, 2004). L'apprentissage contribue donc à la régulation et à l'adaptation des comportements. Il peut se faire par expérience (apprentissage associatif ou non) ou par transmission (observation, imitation...) et est étroitement lié aux capacités de mémorisation de l'individu. Apprentissage et mémoire constituent néanmoins deux concepts distincts.

La mémoire est un processus cognitif permettant le traitement, le stockage et la restitution des informations. Elle fait intervenir l'hippocampe, structure corticale du système nerveux central incluse dans le système limbique. L'hippocampe joue notamment un rôle de premier plan dans la représentation de l'espace et donc dans l'apprentissage et la mémoire spatiale (Bingman et Sharp, 2006). Chez le rat, les lésions hippocampiques induisent en effet des déficits massifs dans la plupart des tâches spatiales (Poucet et Benhamou, 1997). Il existe au moins trois types de mémoire (Bérubé, 1991). Bien que leurs mécanismes diffèrent, ces trois systèmes s'enchaînent naturellement et peuvent être considérés comme trois stades nécessaires à la mémorisation durable d'un souvenir :

- La **mémoire sensorielle** représente l'aptitude à conserver brièvement (moins d'une seconde) une empreinte laissée par un ou plusieurs stimuli sensoriels. Celle-ci ne nécessite pas d'attention car le stockage se fait automatiquement lors de la perception. Elle est toutefois essentielle car c'est elle qui procure l'effet d'unité lorsque les organes sensoriels examinent les détails d'un objet.
- La **mémoire à court terme** (mémoire immédiate, mémoire de travail...) fait intervenir l'attention et correspond à la rétention temporaire de l'information en cours de traitement. Après une durée inférieure à la minute, l'information est perdue si elle n'est pas consolidée dans la mémoire à long terme.
- La **mémoire à long terme** (mémoire procédurale, mémoire de référence...) désigne la capacité d'emmagasiner des informations au-delà du court laps de temps accordé par la mémoire à court terme (processus de consolidation mnésique).

Les résultats présentés dans le chapitre précédent montrent que la cautérisation bilatérale se traduit par une absence de respiration nasale et, chez les femelles, par une atrophie des bulbes olfactifs. De telles modifications devraient se traduire par une hyposmie susceptible de perturber l'acquisition des informations spatiales et donc le comportement exploratoire. En effet, bien que la vision constitue une modalité fondamentale dans la perception des informations spatiales (y compris chez les espèces macrosomatiques - Poucet et Save, 2004), l'olfaction joue néanmoins un rôle de premier plan dans l'acquisition du comportement exploratoire chez le raton. Celui-ci peut par exemple utiliser les variations spatiales et temporelles de l'intensité d'une odeur pour tirer des informations quant à la direction et à la distance d'une source odorante (Gomez et Atema, 1996; Rajan *et al.*, 2006). Avant l'acquisition de la vision (J14), l'olfaction joue donc un rôle primordial dans les mécanismes d'orientation, attraction ou évitement, en fonction des caractéristiques du stimulus. Néanmoins, les conséquences de l'obstruction nasale précoce sur les capacités d'orientation et d'investigation n'ont, à notre connaissance, jamais été examinées.

Pour ces différentes raisons, la problématique du travail expérimental présenté dans cette partie est la suivante :

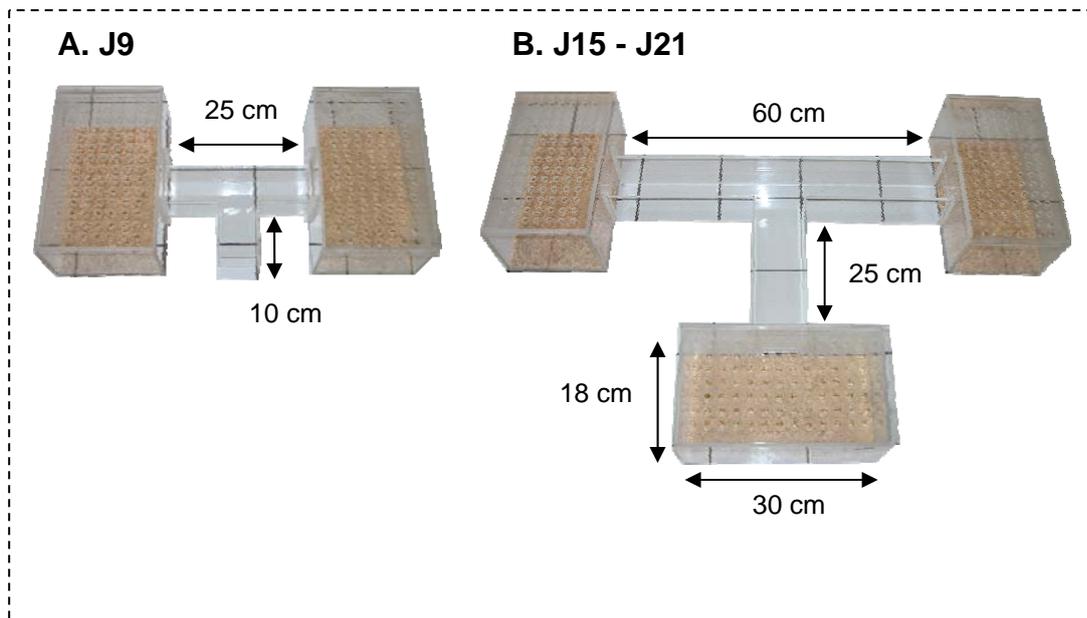
- *Quel est l'impact fonctionnel de l'obstruction nasale bilatérale sur les capacités d'orientation, d'investigation et de mémorisation du rat en développement ?*

## **4.2 Matériel et méthodes expérimentales**

Toutes les observations comportementales sont effectuées durant la phase nocturne entre 09.00 h et 12.00 h. Les différents dispositifs sont maintenus dans la même position tout au long des expériences.

### **4.2.1 Orientation par rapport à l'environnement olfactif familier**

Afin d'évaluer la capacité des individus à reconnaître et à s'orienter vers les odeurs familières, des tests comportementaux sont effectués dans un labyrinthe en T à J9, J15 et J21. Le labyrinthe est constitué d'une branche centrale (branche de départ) et de deux branches latérales fermées par des enceintes expérimentales (figure 16). Ces dernières sont munies de portes amovibles et perforées permettant la diffusion des molécules odorantes. Deux tailles de labyrinthe sont utilisées afin d'adapter le test à la croissance des rats (J9 : 10 x 6 x 6 cm; J15 et J21 : 25 x 8 x 8 cm).



**Figure 16.** Dispositifs expérimentaux utilisés pour tester l'orientation vis-à-vis de l'environnement familier. Deux tailles de labyrinthe sont utilisées afin d'adapter le test au développement neuromoteur des jeunes. (A) Labyrinthe utilisé le 9<sup>ème</sup> jour postnatal. (B) Labyrinthe utilisé les 15<sup>ème</sup> et 21<sup>ème</sup> jours postnatals. *Photographies réalisées au laboratoire.*

Les jeunes ( $n = 15$  rats / groupe / âge / sexe) sont exposés successivement à deux tests comportementaux différents :

- **Sciure propre x sciure propre** : les ratons doivent choisir entre deux enceintes expérimentales identiques dont le sol est recouvert par  $45 \pm 5$  g de sciure propre. Il s'agit d'un test témoin pour vérifier si le choix du raton est aléatoire et non orienté.
- **Sciure nid x sciure propre** : les jeunes sont soumis à l'odeur provenant d'une enceinte expérimentale dont le sol est recouvert par  $45 \pm 5$  g de sciure propre. L'autre enceinte contient  $45 \pm 5$  g de sciure imprégnée d'urine et de fécès maternels prélevée dans la cage d'élevage 5 min avant le début du test.

Dans les deux cas, les enceintes expérimentales sont placées de façon aléatoire d'un côté ou de l'autre du labyrinthe. Entre chaque animal, le labyrinthe est brièvement nettoyé à l'alcool à 70° puis laissé à sécher durant le passage de deux individus (8 min environ). La période d'observation dure 3 min et débute lorsque le raton, placé face au tube impair du labyrinthe (à J9) ou dans l'enceinte neutre de la branche impaire du dispositif (à J15 et J21), pénètre dans le labyrinthe. La porte guillotine centrale est alors fermée et différents paramètres sont pris en compte :

- Le nombre de jeunes effectuant un choix. Si au bout de 3 min le raton n'est pas entré dans le labyrinthe, l'expérience est arrêtée. Les animaux n'effectuant pas de choix sont écartés de la suite des analyses.
- La nature du 1<sup>er</sup> choix défini par la 1<sup>ère</sup> prise de contact avec une enceinte expérimentale.
- Le temps mis, ou latence, avant d'effectuer le 1<sup>er</sup> choix.
- Le temps passé dans chacune des branches du labyrinthe.

#### 4.2.2 Réactions vis-à-vis de la nouveauté

Afin de caractériser les effets de l'obstruction nasale sur l'investigation de l'environnement non familial, des tests d'exploration libre sont effectués selon le protocole établi précédemment par Will *et al.* (1986). Ces tests nécessitent que les jeunes soient sevrés au moment des observations et sont donc réalisés à 21 jours uniquement. Le protocole comprend une phase d'habituation et deux tests expérimentaux successifs :

- **Phase d'habituation** : A 20 jours, 24h avant le début des observations, les jeunes ( $n = 15$  / groupe / sexe) sont placés dans des enceintes (30 x 20 x 20 cm) compartimentées en six box équivalents communiquant entre eux par des ouvertures (4 x 5 cm). Le dispositif est divisé dans le sens de la longueur par trois portes

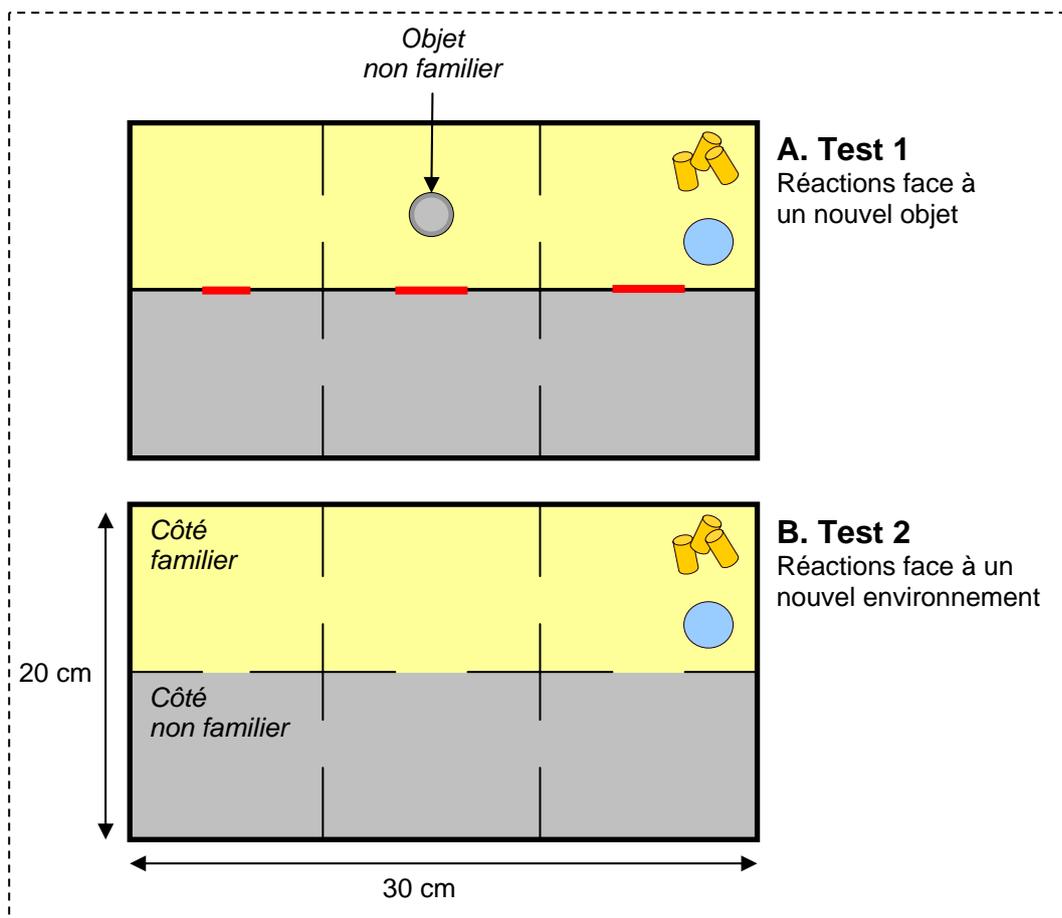
guillotines (figure 17). Le sol de la partie occupée est recouvert par de la sciure et les jeunes sont nourris et abreuvés *ad libitum* durant toute la durée de l'expérience.

- **Réactions face à un nouvel objet** : 24 h après avoir placé le jeune dans le dispositif, un nouvel objet est déposé dans le compartiment central de l'environnement familial (figure 17A). Il s'agit d'un bouchon en caoutchouc d'une hauteur de 4 cm et d'un diamètre d'environ 3 cm. Les réactions du jeune face à ce nouvel objet sont observées durant 10 min. Toutes les 10 secondes, l'observateur note si le rat flaire l'objet, l'attaque (déplacement rapide en direction de l'objet et/ou morsure) ou l'escalade (comptabilisée si au moins deux pattes sont posées sur l'objet). De plus, le temps de latence de la première interaction et le nombre total d'interactions avec l'objet sont notés. À la fin du test, le nouvel objet est retiré du dispositif.
- **Réactions face à un nouvel environnement** : 1 h 30 après la fin du premier test, les portes guillotines sont ouvertes et le rat a accès à l'ensemble du dispositif (figure 17B). Chaque rat est observé pendant 10 min et ses réactions face au nouvel environnement sont notées. Le nombre de visites dans les compartiments familiaux et non familiaux ainsi que le temps passé du côté familial et non familial sont comptabilisés.

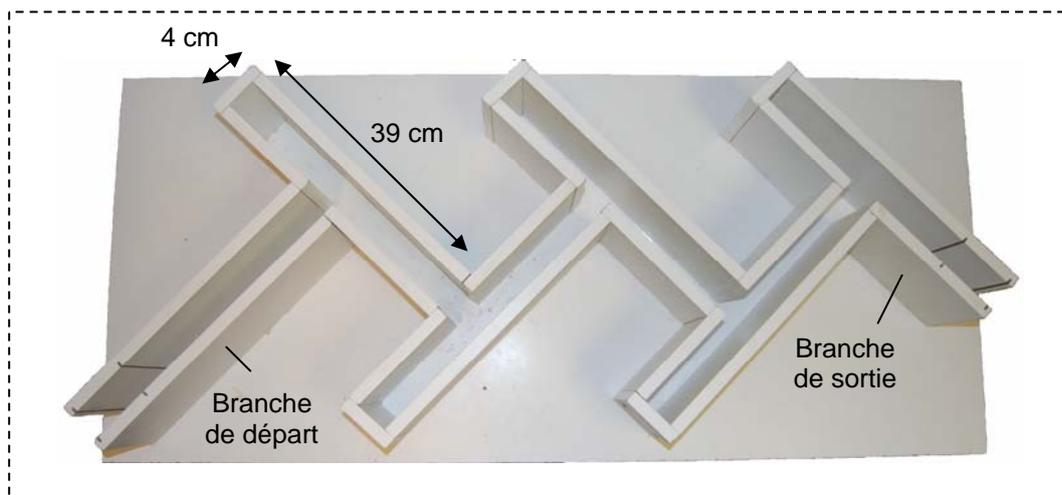
#### 4.2.3 Apprentissage et mémoire spatiale

L'apprentissage et la mémoire spatiale des animaux sont testés dans un labyrinthe en épi constitué de trois labyrinthes en T successifs (figure 18). Toutes les branches sont de dimensions égales : 39 x 4 x 15 cm. La branche de départ est équipée d'une porte guillotine facilitant l'entrée des individus dans le labyrinthe et lors des observations, l'ensemble du dispositif est recouvert d'une plaque de plexiglas afin de maintenir les animaux dans le labyrinthe. Ces tests comportementaux nécessitent que la marche quadrupède et la vision soient fonctionnelles, ils sont donc entrepris à partir du 14<sup>ème</sup> jour postnatal.

Pendant cinq jours, de J14 à J18, les individus sont placés deux fois de suite dans le dispositif pour évaluer leurs capacités d'apprentissage. Les rats sont ensuite laissés au repos pendant trois jours puis testés une seule fois à J21 afin de savoir si l'obstruction nasale affecte la mémoire spatiale. A chaque essai, trois croquettes de nourriture sont placées à la sortie du labyrinthe afin d'exacerber la motivation des ratons et le labyrinthe est brièvement nettoyé à l'alcool à 70° entre chaque individu.



**Figure 17.** Dispositif expérimental utilisé pour tester les réactions des animaux face à la nouveauté. (A) Les jeunes de 21 jours sont observés 10 min dans le cadre du test 1 avant d’être laissés au repos pendant 1h30. (B) Les portes guillottes séparant le dispositif dans le sens de la longueur sont alors ouvertes et les réactions vis-à-vis de l’environnement non familier sont observées durant 10 min.



**Figure 18.** Labyrinthe en épi utilisé pour tester l’apprentissage (J14 à J18) et la mémoire (J21) spatiale. Toutes les branches mesurent 39 cm de long. La branche de départ peut être équipée de portes guillottes facilitant l’entrée des animaux dans le dispositif. Le labyrinthe est recouvert d’une plaque de plexiglas au moment des observations. Photographie réalisées au laboratoire.

Le comportement des animaux est observé pendant 10 min et les paramètres pris en compte sont :

- **Le nombre d'erreurs** : nombre d'entrées dans un cul-de-sac et nombre de demi-tours volontaires (un demi-tour est comptabilisé comme une erreur à partir du moment où le rat possède d'autres chemins possibles).
- **Le temps total passé dans le labyrinthe** : Ce laps de temps débute avec l'ouverture de la porte guillotine et s'achève avec l'entrée de l'individu dans la branche de sortie du labyrinthe.

#### 4.2.4 Analyses statistiques

Les tests d'orientation vis-à-vis de l'environnement familier sont analysés au moyen du test du chi-2 pour échantillons indépendants pour le nombre de jeunes effectuant un choix et pour le taux de retour au nid. Une ANOVA à deux facteurs (sexe \* traitement) est utilisée pour analyser la latence du premier choix et le temps passé dans chacune des branches du labyrinthe. Dans ce cas, le test PLSD de Fischer est utilisé a posteriori pour comparer les moyennes spécifiques de chaque groupe expérimental.

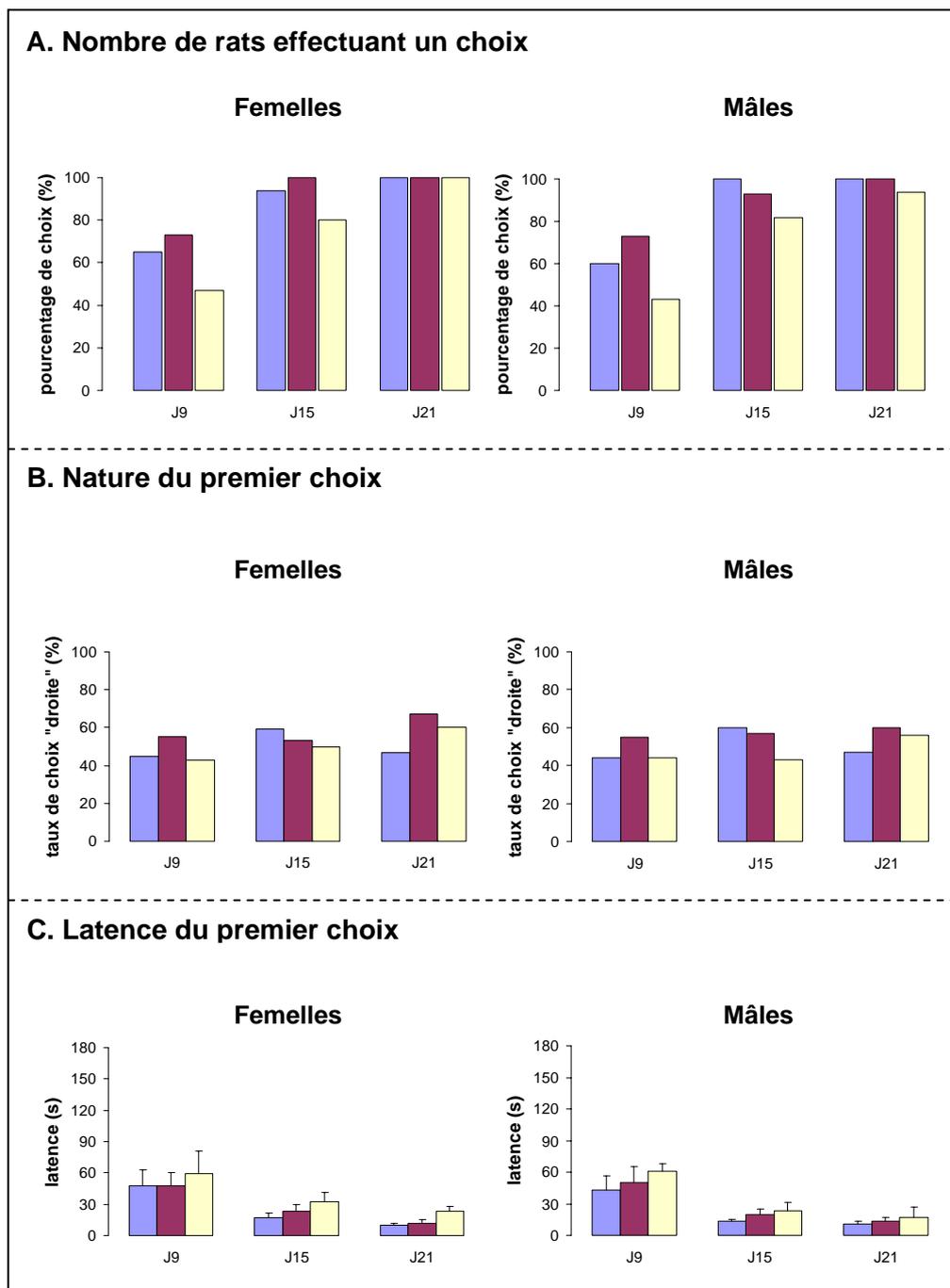
Les réactions face à la nouveauté, l'apprentissage et la mémoire spatiale sont analysées à l'aide d'une ANOVA à deux facteurs (sexe \* traitement), puis la comparaison intergroupe est établie avec le test PLSD de Fischer. En ce qui concerne l'apprentissage du labyrinthe en épi, l'évolution au cours de la période d'observation est en outre analysée par le test t de Student pour échantillons appariés.

### 4.3 Résultats

#### 4.3.1 Obstruction nasale et comportement exploratoire d'orientation

##### 4.3.1.1 *Test "Sciure propre x sciure propre"*

**Taux de jeunes effectuant un choix (figure 19A).** Quel que soit l'âge et les comparaisons considérées, il n'y a aucune différence significative quant au nombre de jeunes effectuant un choix (J9 :  $0,02 < \chi^2 < 2,17$  et  $0,141 < p < 0,886$ ; J15 :  $0,01 < \chi^2 < 1,48$  et  $0,224 < p < 0,999$ ; J21 :  $\chi^2 < 0,0001$  et  $p > 0,999$  lorsque le degré de liberté est suffisant pour calculer le  $\chi^2$ ). A J9, le pourcentage de jeune effectuant un choix oscille entre 43 et 73%. A J15, plus de 80% des ratons réalisent un choix et à J21, plus de 90% des animaux choisissent l'une des deux branches expérimentales. Les jeunes n'ayant pas



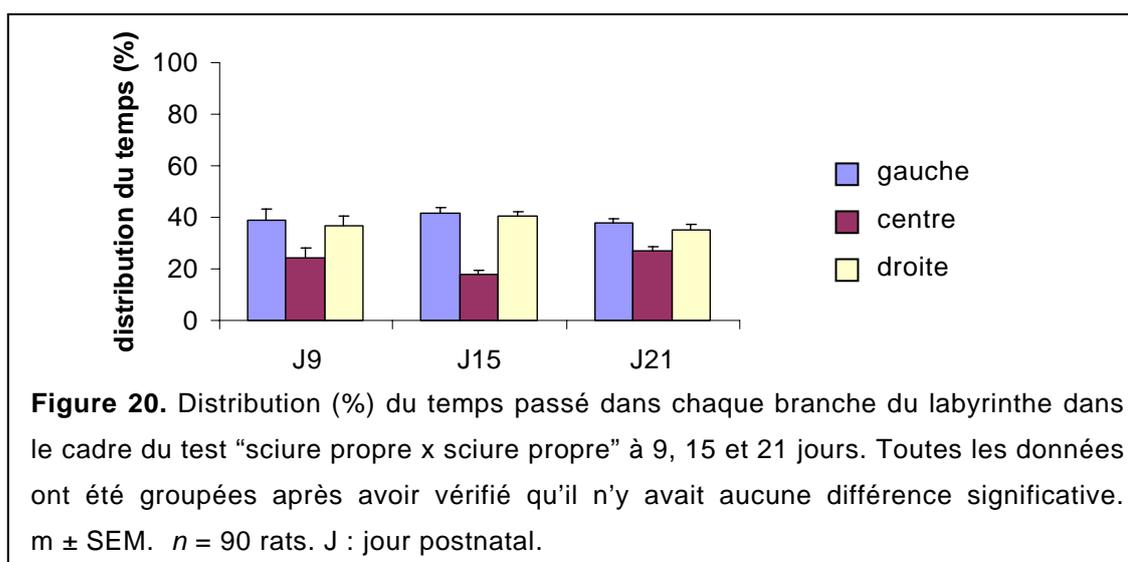
**Figure 19.** Impacts de l'obstruction nasale précoce sur le comportement des animaux soumis au test "sciure propre x sciure propre". (A) Pourcentage de rat effectuant un choix, (B) pourcentage de rat se dirigeant vers la branche droite du labyrinthe en première intention et (C) latence du premier choix à 9, 15 et 21 jours chez les animaux témoins (■), contrôles (■) et obstruction nasale (■). Les données sont présentées sous forme de pourcentage (A et B) ou de moyenne  $\pm$  SEM (C).  $n = 15$  rats / groupe / âge / sexe. J : jour postnatal.

effectué de choix au cours de la période d'observation ont été écartés des analyses statistiques présentées dans la suite de ces résultats.

**Nature du premier choix (figure 19B).** Quel que soit l'âge et le groupe considéré, tous les individus réalisent un choix statistiquement comparable à un choix aléatoire et non orienté : les individus se répartissent à près de 50% dans chacune des branches expérimentales ( $0,01 < \chi^2 < 0,35$  et  $0,551 < p < 0,999$ ).

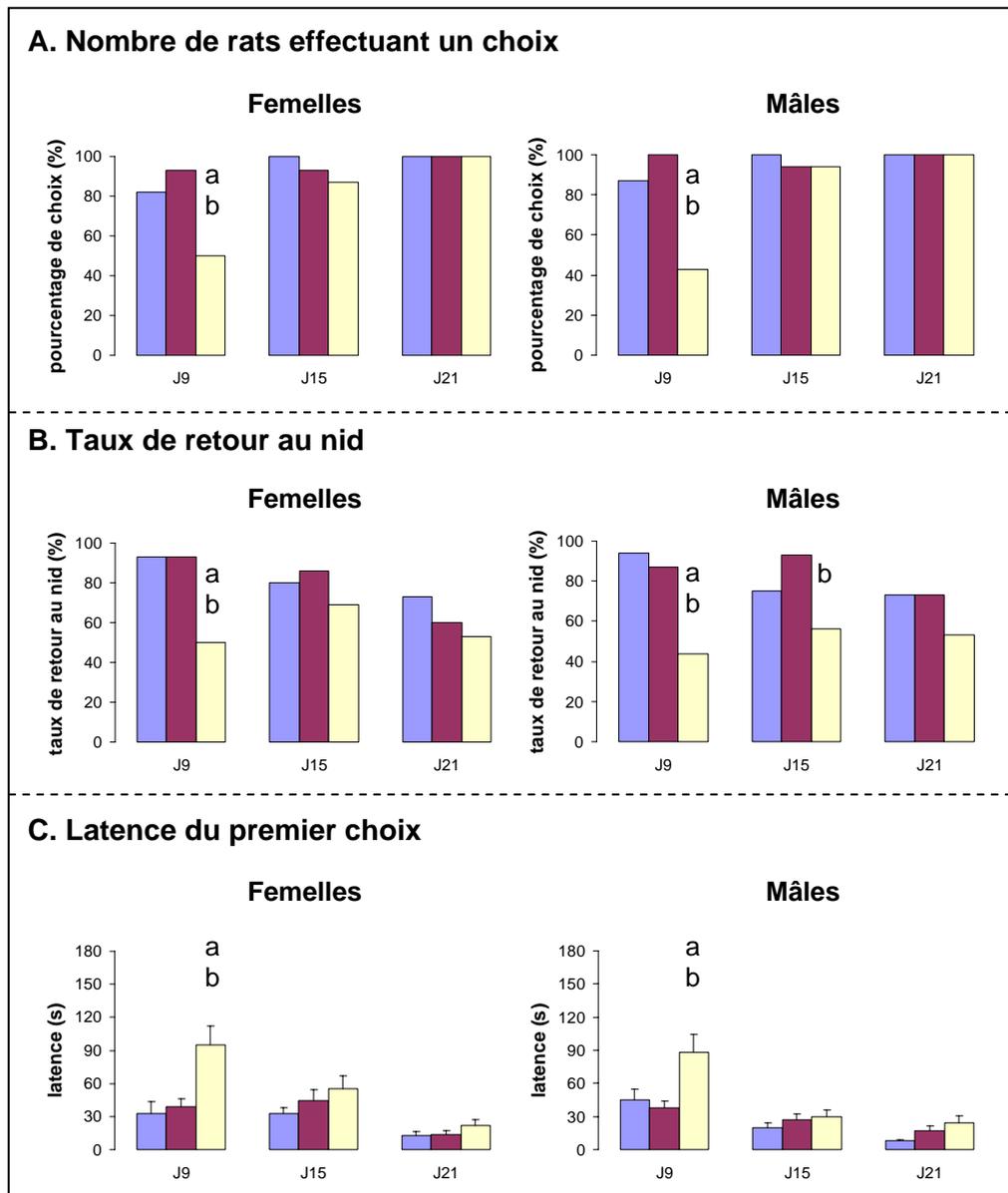
**Latence du premier choix (figure 19C).** Quel que soit l'âge considéré, la latence du premier est comparable entre les différents lots expérimentaux (J9 :  $F = 0,36$  et  $p = 0,875$  ; J15 :  $F = 0,79$  et  $p = 0,560$  ; J21 :  $F = 1,77$  ;  $p = 0,137$ ). Le temps mis pour effectuer le choix est maximal au 9<sup>ème</sup> jour postnatal et décroît par la suite.

**Temps passé dans chaque branche du labyrinthe (figure 20, ci-dessous).** Quel que soit l'âge considéré, le temps passé dans chacune des branches est comparable entre les différents lots expérimentaux ( $0,08 < F < 1,63$  et  $0,162 < p < 0,996$ ). Les individus passent environ 20% de leur temps dans la branche centrale et 40% de leur temps dans chacune des branches expérimentales.



#### 4.3.1.2 Test "Sciure nid x sciure propre"

**Taux de jeunes effectuant un choix (figure 21A).** Vingt-quatre heures après le traitement, les animaux exposés à l'obstruction nasale font significativement moins de choix que les jeunes témoins ( $\chi^2 = 3,88$  ;  $p = 0,048$  chez les femelles ;  $\chi^2 = 5,96$  ;  $p = 0,015$  chez les mâles) et contrôles ( $\chi^2 = 5,17$  ;  $p = 0,023$  chez les femelles ;  $\chi^2 = 10,41$  ;  $p = 0,001$  chez les mâles). Le nombre de choix effectués par les individus témoins et contrôles de neuf jours est en revanche similaire ( $\chi^2 = 0,16$  ;  $p = 0,688$  chez les femelles ;  $\chi^2 = 0,50$  ;  $p = 0,479$  chez les mâles). Quel que soit le sexe considéré, il n'y a plus aucune différence



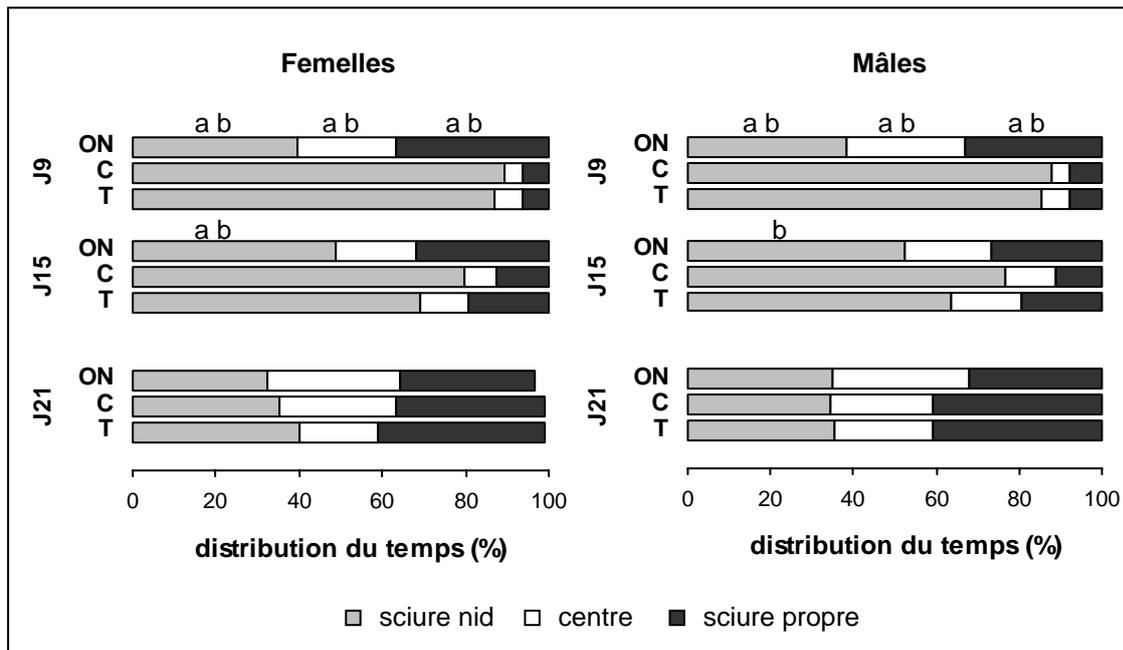
**Figure 21.** Impacts de l'obstruction nasale précoce sur le comportement des animaux soumis au test "sciure nid x sciure propre". (A) Pourcentage de rat effectuant un choix, (B) taux de retour au nid en première intention et (C) latence du premier choix à 9, 15 et 21 jours chez les animaux témoins (■), contrôles (■) et obstruction nasale (■). Les données sont présentées sous forme de pourcentage (A et B) ou de moyenne  $\pm$  SEM (C).  $n = 15$  rats / groupe / âge / sexe. J : jour postnatal. Latence du premier choix : analyse de l'ANOVA à 2 facteurs (effet traitement), J9:  $F = 14,92$  à 2 degrés de liberté,  $p < 0,0001$ . Analyse du chi-2 pour données indépendantes (A et B) ou du PLSD de Fischer (C) : <sup>a</sup>  $p < 0,05$  comparé aux témoins; <sup>b</sup>  $p < 0,05$  comparé aux contrôles.

significative à 15 et 21 jours ( $0,001 < \chi^2 < 2,83$ ;  $0,093 < p < 0,999$ ). À ces âges, une grande majorité de rats réalisent un choix (plus de 80% à J15 et 100% à J21). Les jeunes n'ayant pas effectué de choix au cours de la période d'observation ont été écartés des analyses statistiques présentées dans la suite de ces résultats.

**Taux de retour au nid (figure 21B).** À 9 jours, alors que les jeunes exposés à l'obstruction nasale réalisent un choix proche du choix aléatoire (50%), les animaux témoins et contrôles choisissent majoritairement le nid en première intention (plus de huit fois sur dix). À cet âge, le taux de retour au nid est significativement plus faible chez les individus ON que chez les individus témoins ( $\chi^2 = 5,32$ ;  $p = 0,021$  chez les femelles;  $\chi^2 = 4,47$ ;  $p = 0,034$  chez les mâles) et contrôles ( $\chi^2 = 5,32$ ;  $p = 0,021$  chez les femelles;  $\chi^2 = 4,85$ ;  $p = 0,028$  chez les mâles). Cette différence tend à se réduire à J15 et J21. En effet, le 15<sup>ème</sup> jour postnatal, la seule différence observée concerne les mâles exposés à l'obstruction nasale qui retournent significativement moins au nid que les mâles contrôles ( $\chi^2 = 3,84$ ;  $p = 0,050$ ). Le taux de retour au nid est comparable entre les autres lots expérimentaux ( $0,01 < \chi^2 < 0,84$ ;  $0,361 < p < 0,919$ ). Il n'y a plus aucune différence significative à 21 jours ( $0,01 < \chi^2 < 1,53$ ;  $0,216 < p < 0,999$ ).

**Latence du premier choix (figure 21C).** Il existe des différences significatives entre les groupes expérimentaux à J9 ( $F = 14,92$ ;  $p < 0,0001$ ), mais pas à J15 ( $F = 2,03$ ;  $p = 0,101$ ) et J21 ( $F = 2,23$ ;  $p = 0,063$ ). En effet, vingt-quatre heures après le traitement, les animaux exposés à l'obstruction nasale mettent significativement plus de temps pour effectuer leur premier choix que les animaux témoins ( $p = 0,0002$  chez les femelles;  $p = 0,006$  chez les mâles) et contrôles ( $p = 0,0006$  chez les femelles;  $p = 0,001$  chez les mâles). Il n'y a en revanche aucune différence significative entre les groupes témoin et contrôle ( $p = 0,642$  chez les femelles;  $p = 0,555$  chez les mâles).

**Temps passé dans chaque branche du labyrinthe (figure 22).** Le pourcentage de temps passé dans chaque branche du labyrinthe diffère de façon significative selon les groupes expérimentaux à J9 ( $F = 23,84$ ;  $p < 0,0001$  pour le côté "sciure nid";  $F = 7,93$ ;  $p = 0,0008$  pour la branche centrale;  $F = 10,00$ ;  $p = 0,0002$  pour le côté "sciure propre"). À J15, seul le pourcentage de temps passé du côté du nid est significativement différent en fonction des groupes ( $F = 4,48$ ;  $p = 0,001$  pour le côté "sciure nid";  $F = 2,11$ ;  $p = 0,073$  pour la branche centrale;  $F = 2,32$ ;  $p = 0,051$  pour le côté "sciure propre"). Il n'y a plus aucune différence significative à J21 ( $F = 0,37$ ;  $p = 0,865$  pour le côté "sciure nid";  $F = 1,54$ ;  $p = 0,188$  pour la branche centrale;  $F = 0,59$ ;  $p = 0,710$  pour le côté "sciure propre"). Ainsi, 24h après le traitement et quel que soit leur sexe, les animaux exposés à l'obstruction nasale passent significativement moins de temps du côté du nid que les individus témoins et contrôles ( $p < 0,0001$  dans tous les cas). Cette différence s'établit au détriment du temps passé dans la branche centrale ( $0,003 < p < 0,046$ ) et du temps



**Figure 22.** Distribution (%) du temps passé dans chaque branche du labyrinthe dans le cadre du test “sciure nid x sciure propre” à 9, 15 et 21 jours chez les animaux témoins (T), contrôles (C) et obstruction nasale (ON). Les données sont présentées sous forme de moyenne.  $n = 15$  rats / groupe / âge / sexe. J : jour postnatal. Analyse de l’ANOVA à 2 facteurs (effet traitement), J9:  $F = 23,84$  à 2 degrés de liberté,  $p < 0,0001$  pour la sciure nid;  $F = 7,93$  à 2 degrés de liberté,  $p = 0,0008$  pour la branche centrale;  $F = 10,00$  à 2 degrés de liberté,  $p = 0,0002$  pour la sciure propre. J15:  $F = 4,48$  à 2 degrés de liberté,  $p = 0,001$  pour la sciure nid. Analyse du PLSD de Fischer : <sup>a</sup>  $p < 0,05$  comparé aux témoins; <sup>b</sup>  $p < 0,05$  comparé aux contrôles.

passé du côté "sciure propre" ( $0,003 < p < 0,010$ ). À 15 jours, le temps passé du côté du nid reste inférieur chez les femelles exposées à l'obstruction nasale ( $p = 0,010$  vs témoins;  $p = 0,0004$  vs contrôles), alors que chez les mâles, la différence est uniquement significative vis-à-vis des animaux contrôles ( $p = 0,159$  vs témoins;  $p = 0,003$  vs contrôles). Enfin, les individus témoins et contrôles distribuent leur temps de manière similaire indépendamment de leur âge ou de leur sexe ( $0,235 < p < 0,997$ ).

#### 4.3.2 Obstruction nasale et comportement exploratoire d'investigation

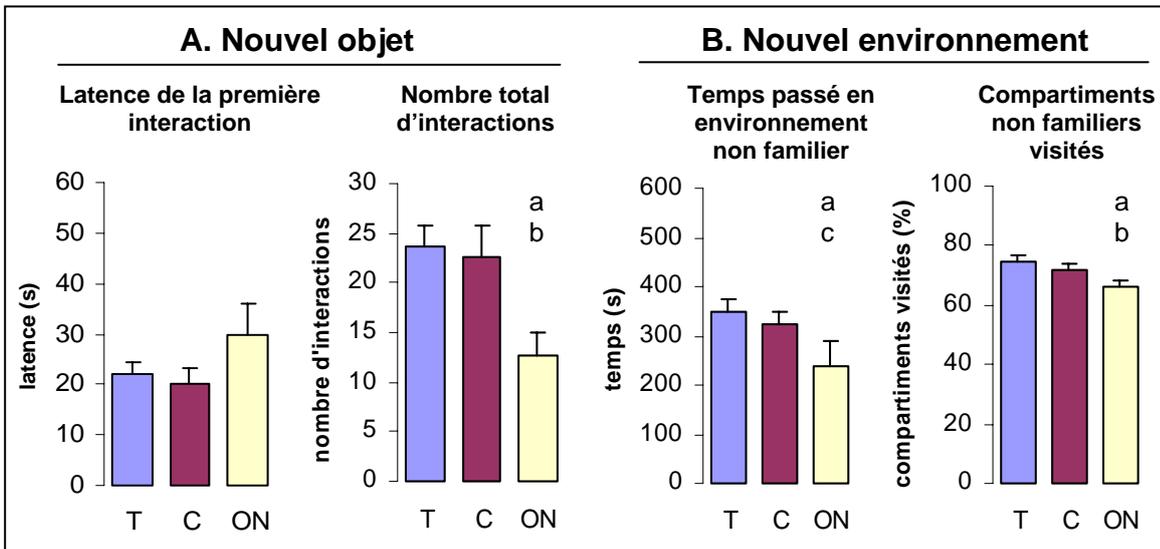
##### 4.3.2.1 *Face à un nouvel objet*

Lorsqu'un nouvel objet est placé dans l'environnement familial des rats (figure 23A), une différence significative est détectée pour la latence de la première interaction ( $F = 2,67$ ;  $p = 0,027$ ). En effet, les mâles exposés à l'obstruction nasale présentent une latence supérieure à celle des mâles témoins et contrôles (respectivement  $p = 0,006$  et  $p = 0,005$ ), alors qu'il n'y a aucune différence significative chez les femelles ( $p = 0,269$  vs témoins;  $p = 0,149$  vs contrôles). Néanmoins, certains individus du groupe ON (deux femelles et un mâle) n'ont effectué aucun contact avec l'objet pendant la période d'observation (comportement de "freezing") et ceux-ci ont donc été écartés de l'analyse statistique. Il y a également une différence significative pour le nombre total d'interactions ( $F = 5,75$ ;  $p = 0,005$ ). Les rat ON réalisent moins de contacts avec l'objet que les rats témoins ou contrôles que ce soit chez les femelles ( $p = 0,005$  vs témoins;  $p = 0,007$  vs contrôles) ou chez les mâles ( $p = 0,024$  vs témoins;  $p = 0,041$  vs contrôles). D'un autre côté, la qualité des interactions n'est pas affectée par l'obstruction nasale (tableau 5 ci-dessous). Ainsi, les taux de flairages ( $F = 0,40$ ;  $p = 0,846$ ), d'attaques ( $F = 1,61$ ;  $p = 0,166$ ) et d'escalades ( $F = 0,08$ ;  $p = 0,996$ ) des différents lots expérimentaux ne sont pas statistiquement différents.

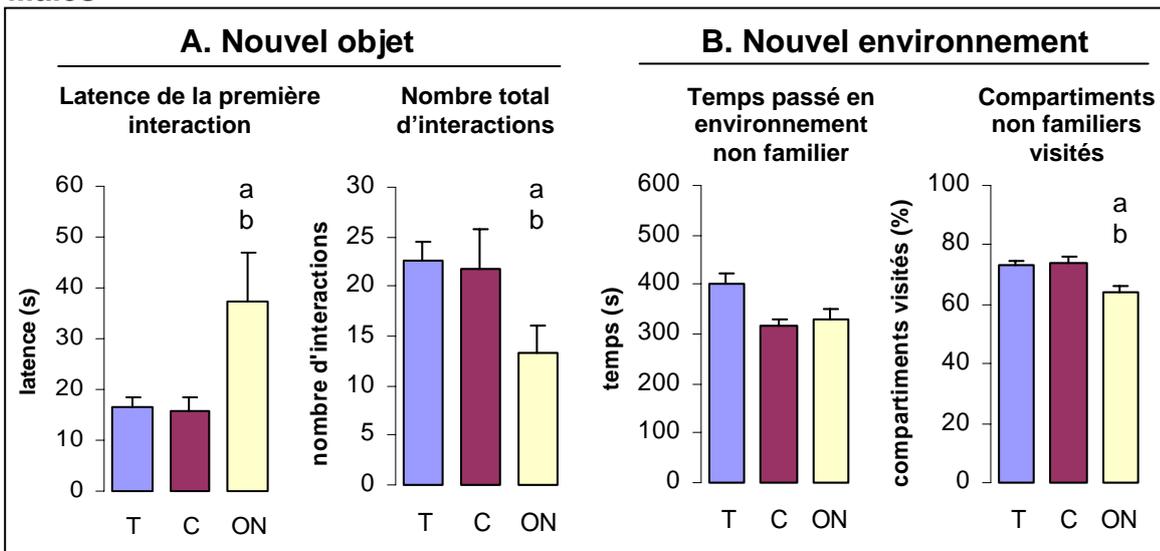
		Flairages (%)	Attaques (%)	Escalades (%)
femelles	Témoins	68 ± 7	14 ± 4	18 ± 4
	Contrôles	65 ± 8	14 ± 4	21 ± 5
	Obstruction nasale	74 ± 6	7 ± 3	19 ± 6
mâles	Témoins	59 ± 7	23 ± 5	18 ± 5
	Contrôles	64 ± 10	17 ± 6	19 ± 7
	Obstruction nasale	66 ± 9	12 ± 4	22 ± 7

**Tableau 5.** Qualité des interactions (%) lors des tests de réactions face à un nouvel objet chez les animaux témoins, contrôles et obstruction nasale de 21 jours.  $m \pm SEM$ .  $n = 15$  rats / groupe / âge / sexe.

## Femelles



## Mâles



**Figure 23.** Réactions vis-à-vis de la nouveauté chez des animaux témoins (T), contrôles (C) et obstruction nasale (ON) de 21 jours. (A) Réactions face à un nouvel objet et (B) réactions face à un nouvel environnement.  $m \pm SEM$ .  $n = 15$  rats / groupe / sexe. Analyse de l'ANOVA à 2 facteurs (effet traitement) : latence de la 1<sup>ère</sup> interaction :  $F = 2,67$  à 2 degrés de liberté,  $p = 0,027$ ; nombre d'interactions :  $F = 5,75$  à 2 degrés de liberté,  $p = 0,005$ ; temps passé en environnement non familial :  $F = 3,14$  à 2 degrés de liberté,  $p = 0,014$ ; compartiments non familiers visités :  $F = 11,68$  à 2 degrés de liberté,  $p < 0,0001$ . Analyse du PLSD de Fisher : <sup>a</sup>  $p < 0,05$  comparé aux témoins; <sup>b</sup>  $p < 0,05$  comparé aux contrôles; <sup>c</sup>  $p < 0,05$  comparé aux homologues mâles.

#### 4.3.2.2 Face à un nouvel environnement

Lorsqu'ils sont testés pour leurs réactions face à un nouvel environnement (figure 23B), tous les animaux font clairement la distinction entre les environnements familiers et non familiers. On observe des différences significatives concernant le temps passé du côté non familial ( $F = 3,14$ ;  $p = 0,014$ ) et le pourcentage de compartiments non familiers visités ( $F = 11,68$ ;  $p < 0,0001$ ). En effet, les femelles exposées à l'obstruction nasale passent moins de temps du côté non familial comparée à leurs homologues mâles et aux femelles témoins (respectivement  $p = 0,040$  et  $p = 0,007$ ). De plus, le pourcentage de compartiments non familiers visités est plus faible chez les femelles ON ( $p = 0,003$  vs témoins;  $p = 0,034$  vs contrôles) et les mâles ON ( $p = 0,003$  vs témoins;  $p = 0,0008$  vs contrôles).

Que ce soit pour les réactions face à un nouvel objet ou face à un nouvel environnement, aucune différence significative n'est détectée entre les rats témoins et contrôles ( $0,106 < p < 0,837$ ).

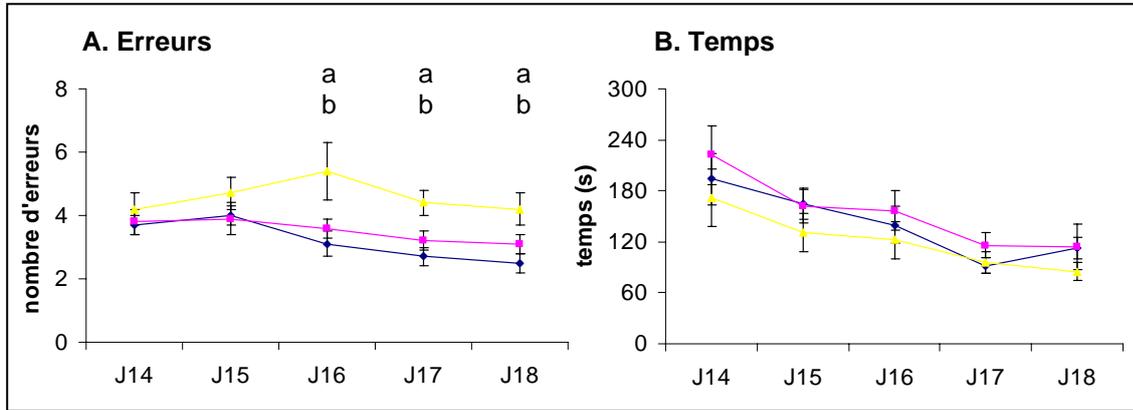
#### 4.3.3 Obstruction nasale, apprentissage et mémoire spatiale

##### 4.3.3.1 *Apprentissage spatial*

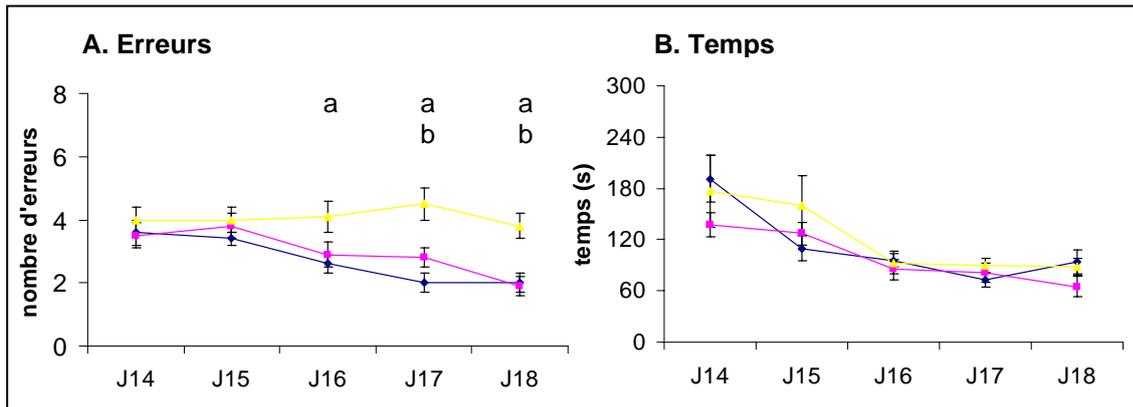
Le nombre d'erreurs et le temps total passé dans le labyrinthe au cours de la phase d'apprentissage sont présentés dans la figure 24, les valeurs affichées représentent la moyenne des deux essais consécutifs. On constate des différences significatives entre les lots expérimentaux pour le nombre d'erreurs à J16 ( $F = 4,23$ ;  $p = 0,002$ ), J17 ( $F = 7,41$ ;  $p < 0,0001$ ) et J18 ( $F = 7,34$ ;  $p < 0,0001$ ). Quel que soit l'âge considéré, il n'y a en revanche aucune différence significative pour le temps passé dans le labyrinthe ( $0,75 < F < 2,23$ ;  $0,058 < p < 0,586$ ). Ainsi, quel que soit le jour considéré, les animaux exposés à l'obstruction nasale effectuent plus d'erreurs que les individus témoins et contrôles (figure 38A). Cette différence devient significative à partir du 16<sup>ème</sup> jour postnatal que ce soit chez les femelles (J16 :  $p = 0,003$  vs témoins et  $p = 0,027$  vs contrôles; J17 :  $p = 0,0008$  vs témoins et  $p = 0,016$  vs contrôles; J18 :  $p = 0,0006$  vs témoins et  $p = 0,037$  vs contrôles) ou chez les mâles (J16 :  $p = 0,039$  vs témoins et  $p = 0,159$  vs contrôles; J17 :  $p < 0,0001$  vs témoins et  $p = 0,003$  vs contrôles; J18 :  $p = 0,001$  vs témoins et  $p = 0,0005$  vs contrôles).

Par ailleurs, contrairement aux individus exposés à l'obstruction nasale, les rats témoins et contrôles effectuent moins d'erreurs à J18 qu'à J14 ( $p = 0,0007$  chez les témoins;  $p = 0,003$  chez les contrôles;  $p = 0,801$  chez les animaux exposés à l'obstruction nasale).

## Femelles

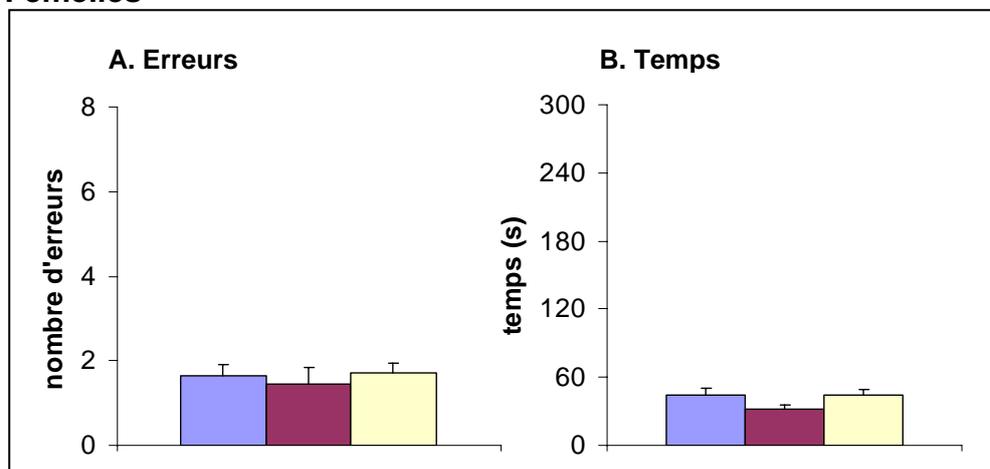


## Mâles

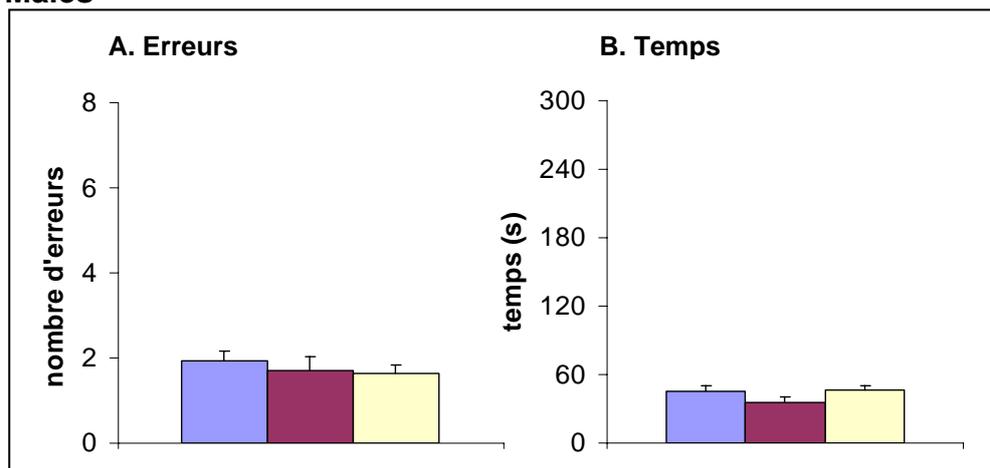


**Figure 24.** (A) Nombre d'erreurs et (B) temps total passé dans le labyrinthe chez les animaux témoins (■), contrôles (■) et obstruction nasale (■) du 14<sup>ème</sup> au 18<sup>ème</sup> jour postnatal.  $m \pm SEM$ . Les valeurs affichées représentent la moyenne des deux essais consécutifs.  $n = 15$  rats / groupe / âge / sexe. J : jour postnatal. Analyse de l'ANOVA à 2 facteurs pour le nombre d'erreurs (effet traitement), J16 :  $F = 4,23$  à 2 degrés de liberté,  $p = 0,002$ ; J17 :  $F = 7,41$  à 2 degrés de liberté,  $p < 0,0001$ ; J18 :  $F = 7,34$  à 2 degrés de liberté,  $p < 0,0001$ . Analyse du PLSD de Fischer : <sup>a</sup>  $p < 0,05$  par rapport aux témoins; <sup>b</sup>  $p < 0,05$  par rapport aux contrôles.

## Femelles



## Mâles



**Figure 25.** (A) Nombre d'erreurs et (B) temps total passé dans le labyrinthe chez les animaux témoins (■), contrôles (■) et obstruction nasale (■) de 21 jours.  $n = 15$  rats / groupe / âge / sexe.  $m \pm$  SEM. Un seul essai est effectué à 21 jours. Il n'y a aucune différence significative.

Le temps passé dans le labyrinthe est quant à lui plus faible à J18 qu'à J14 et ce, quel que soit le groupe expérimental ( $p = 0,0009$  chez les témoins;  $p < 0,0001$  chez les contrôles;  $p = 0,005$  chez les animaux exposés à l'obstruction nasale). Le temps passé dans le labyrinthe est ainsi divisé par deux au cours de la période d'observation : 182 secondes à J14 contre 91 secondes à J18 (moyennes incluant tous les groupes expérimentaux).

#### 4.3.3.2 Mémoire spatiale

Le nombre d'erreurs et le temps total passé dans le labyrinthe à J21 sont présentés dans la figure 25. À cet âge, un seul essai est réalisé afin d'étudier les impacts de l'obstruction nasale sur la mémoire spatiale. Quels que soient le sexe et la variable considérés, il n'y a aucune différence significative entre les individus témoins, contrôles et obstruction nasale (nombre d'erreurs :  $F = 0,27$  et  $p = 0,930$ ; temps passé dans le labyrinthe :  $F = 1,71$  et  $p = 0,139$ ). Les individus effectuent entre 1 et 2 erreurs et restent 42 secondes en moyenne dans le labyrinthe.

## 4.4 Discussion

Nos résultats montrent que l'obstruction nasale précoce a un impact fonctionnel sur les capacités olfactives qui perturbe l'orientation vis-à-vis du nid 24 h après le traitement. En effet, les animaux de neuf jours exposés à l'obstruction nasale présentent un taux de retour au nid plus faible et distribuent leur temps de manière aléatoire dans les trois branches du labyrinthe. Ces animaux réalisent également moins de choix et affichent un temps de latence élevé comparés aux animaux témoins et contrôles ce qui suggère une perturbation du comportement exploratoire d'investigation. Ces données pourraient être expliquées non seulement par la privation olfactive, mais également par l'accroissement du niveau d'anxiété qui pourrait agir sur l'investigation de l'environnement. Comparativement à ces résultats, l'absence de différence significative à neuf jours dans le test "sciure propre x sciure propre" montre qu'à cet âge, l'odeur du nid constitue un stimulus attractif susceptible d'induire une activité locomotrice chez les jeunes témoins et contrôles.

En termes de récupération après la réouverture des narines, les différences observées pour le nombre de choix et la latence du premier choix sont totalement abrogées à J15, alors que le taux de retour au nid et le temps passé du côté du nid restent significativement différents. Ceci suggère un rétablissement rapide du comportement exploratoire et une récupération plus lente des capacités olfactives en dépit de la

réouverture des narines. Le prompt rétablissement du comportement exploratoire pourrait être expliqué par le fait qu'avec l'apparition de l'audition à J10 et de la vision à J14, l'importance relative de l'olfaction dans l'expression du comportement exploratoire diminue progressivement au cours du développement. Bien qu'aucune différence significative ne soit détectée à J21, il apparaît difficile de conclure quant au rétablissement complet des capacités olfactives. En effet, à cet âge, les individus témoins et contrôles répartissent leur temps de manière équitable dans les trois branches du labyrinthe et présentent une diminution du taux de retour au nid en première intention. A J21, l'odeur du nid semble donc avoir perdu une partie de son caractère attractif.

Par ailleurs, nos résultats révèlent que les animaux exposés à l'obstruction nasale présentent une perturbation des réactions vis-à-vis de la nouveauté à 21 jours. Ainsi, lorsqu'un nouvel objet est placé dans leur environnement familier, les rats ON réalisent globalement moins d'interactions avec l'objet. La qualité des interactions n'est en revanche pas affectée. De plus, lorsqu'ils sont testés pour leurs réactions face à un nouvel environnement, les animaux exposés à l'obstruction nasale visitent moins de compartiments non familiers que leurs homologues témoins et contrôles. Deux composants interconnectés doivent être pris en compte pour expliquer ces changements comportementaux. Tout d'abord, l'hyposmie accompagnant l'obstruction nasale modifie la perception de l'environnement et doit sans doute agir sur le comportement exploratoire. Dans ce cas, du fait de leur capacité olfactive réduite, les animaux exposés à l'obstruction nasale devraient passer plus de temps à explorer la nouveauté. En second lieu, l'appauvrissement de l'environnement olfactif a pu exacerber le niveau d'anxiété ce qui pourrait influencer les réactions face à la nouveauté. Les animaux exposés à l'obstruction nasale devraient alors passer moins de temps à interagir avec la nouveauté. Par conséquent, nos résultats semblent indiquer un plus grand niveau d'anxiété plutôt qu'une diminution de la perception olfactive à 21 jours.

D'autre part, ces perturbations comportementales semblent plus marquées chez les femelles exposées à l'obstruction nasale. Celles-ci passent en effet moins de temps du côté non familier que leurs homologues mâles. Bardo *et al.* (1996) suggèrent que le comportement de recherche de nouveauté reflète l'activité de l'axe corticotrope. Ainsi, une activation supérieure de l'axe corticotrope chez les femelles pourrait expliquer les différences inter-sexuelles observées dans le cadre de ce test comportemental. Enfin, un comportement de recherche de nouveauté fortement marqué pendant la période de développement se traduit par une prédisposition aux comportements addictifs à l'âge adulte (Wills *et al.*, 1994). En conséquence, on peut se demander si le faible degré de recherche de nouveauté observé chez les animaux exposés à l'obstruction nasale aura

comme conséquence des modifications comportementales durables telles que des difficultés à trouver des partenaires sexuels ou de nouvelles sources de nourriture.

En ce qui concerne l'apprentissage spatial, les animaux du groupe ON réalisent plus d'erreurs que les individus témoins et contrôles bien qu'ils passent autant de temps dans le labyrinthe. De plus, les animaux exposés à l'obstruction nasale effectuent un nombre constant d'erreurs tout au long de la période d'observation, alors que les individus témoins et contrôles présentent un nombre d'erreurs significativement plus faible à J18 qu'à J14. Il est toutefois difficile de conclure quant à ce qui a effectivement été appris par les animaux témoins et contrôles. En effet, la diminution du nombre d'erreurs pourrait simplement refléter une baisse de l'activité exploratrice liée à un phénomène d'habituation.

Dans les tâches d'apprentissage spatial, la performance des animaux dépend de leur capacité à acquérir et à stocker des informations, de leur motivation à trouver la sortie du labyrinthe et de leurs capacités sensorielles et motrices (Dawson *et al.*, 2005). En ce qui concerne l'aspect motivationnel, l'élément utilisé dans notre protocole afin d'exacerber la motivation des individus, à savoir des croquettes de nourriture, reste sans doute relativement inefficace dans la mesure où nous n'avons pas la possibilité de placer les animaux à la diète avant le début des expériences. De plus, les jeunes rats commencent à ingurgiter de la nourriture solide à partir du 18<sup>ème</sup> jour uniquement. D'autres éléments motivationnels auraient pu être utilisés tels que la présence de la mère ou du nid maternel à la sortie du labyrinthe. Néanmoins, l'attractivité de ces éléments diminue fortement entre le 15<sup>ème</sup> et le 21<sup>ème</sup> jour postnatal. Ceci est notamment démontré par la diminution, au cours de cette période, du temps passé près du nid dans le cadre des tests d'orientation par rapport à l'environnement familial. En ce qui concerne l'aspect sensoriel, les tests débutent à J14, c'est-à-dire à la fin de la période d'obstruction nasale. A J15, les tests d'orientation montrent que les capacités olfactives des individus restent perturbées. Cette diminution des capacités sensorielles peut sans doute expliquer, au moins en partie, le nombre d'erreurs effectuées par les animaux exposés à l'obstruction nasale. Ceux-ci se montreraient plus prudents face à un environnement qu'ils auraient des difficultés à percevoir. Par conséquent, les animaux retourneraient visiter les mêmes endroits plusieurs fois.

Par ailleurs, étant donné que la perturbation de l'apprentissage ne semble pas être préjudiciable à la mémoire spatiale, il apparaît difficile de conclure quant à une éventuelle altération des capacités cognitives. En effet, la mesure de l'apprentissage et de la mémoire se fait de manière indirecte à partir de l'observation des changements survenus au niveau d'une performance comportementale (Lassalle, 2004). Dans notre étude, l'absence

d'amélioration de la performance des individus exposés à l'obstruction nasale ne permet pas de conclure sur ce qui a été appris ou non. Cette performance dépend en effet des capacités d'apprentissage et de mémorisation, mais de nombreux autres facteurs sont susceptibles d'intervenir tels que le niveau de stress et l'état physiologique de l'individu.

Dans tous les cas, le fait que les animaux exposés à l'obstruction nasale réalisent, dans un temps comparable, plus d'erreurs que les animaux témoins et contrôles traduit une hyperactivité locomotrice. L'hyperactivité, comme l'altération des réactions face à la nouveauté et la diminution des performances dans les tâches d'apprentissage spatial, est considérée comme une composante essentielle de la réactivité comportementale au stress (Cannizzaro *et al.*, 2005; Cao *et al.*, 2007). Là encore, l'hyposmie et l'anxiété constituent deux paramètres interconnectés susceptibles d'expliquer les modifications comportementales observées suite à l'induction de l'obstruction nasale.

En conclusion, l'obstruction nasale bilatérale perturbe l'orientation vers les odeurs familières, l'investigation de l'environnement non familier et les performances dans une tâche d'apprentissage spatial. L'obstruction nasale affecte donc le comportement exploratoire à différents niveaux et ces modifications pourraient avoir des répercussions comportementales à plus ou moins long terme. Elles pourraient par exemple retarder l'âge de dispersion des jeunes, perturber la capacité à trouver de nouvelles sources de nourriture et/ou altérer la recherche des partenaires sexuels.

# 5

## Conséquences physiologiques de l'obstruction nasale



## 5 Conséquences physiologiques de l'obstruction nasale

L'obstruction nasale bilatérale perturbe le comportement exploratoire et entraîne un taux de mortalité important. Les mécanismes physiologiques à l'origine de ces modifications restent néanmoins à déterminer. D'après la bibliographie (cf. introduction générale), l'obstruction nasale entraîne d'importants troubles olfactifs et respiratoires. Au niveau respiratoire, le passage à une respiration buccale chronique est susceptible d'influencer l'activité électromyographique des muscles oro-faciaux. Par ailleurs, l'hyposmie pourrait perturber le comportement alimentaire. En effet, la compétition entre les processus respiratoire et alimentaire est susceptible d'altérer, d'une part la saisie orale des mamelles, et d'autre part l'ingestion du lait maternel. Ces perturbations devraient agir sur l'homéostasie énergétique et la croissance de l'animal en développement. L'appauvrissement de l'environnement olfactif, associé aux détresses respiratoire et nutritionnelle, constitue une situation stressante multifactorielle susceptible de perturber le développement des systèmes physiologiques périphériques, et notamment le développement du système immunitaire, particulièrement sensible aux effets délétères des glucocorticoïdes.

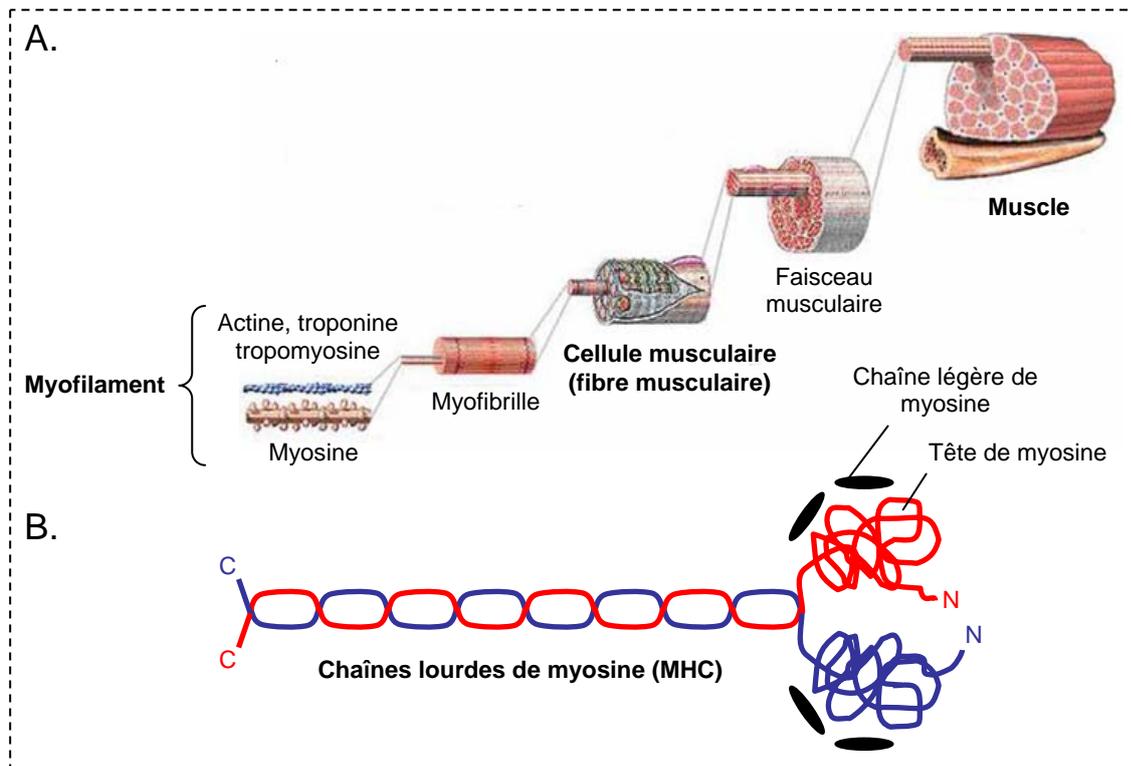
### 5.1 Obstruction nasale, respiration buccale et muscles oro-faciaux

*Le travail expérimental présenté dans cette partie a donné lieu à la rédaction d'un article publié dans la revue "Respiratory Physiology and Neurobiology" [2006, 154 (3) : 443-452] et intitulé "Myosin heavy chain expression and muscle adaptation in rat". Cet article est présenté en annexe 1. Depuis lors, les effectifs ont été complétés afin d'en préciser les résultats.*

#### 5.1.1 Introduction

Les muscles squelettiques présentent une grande diversité de performances et de spécialisations, liée principalement à la diversité des fibres qui les composent. Ils renferment en effet plusieurs types de fibres qui diffèrent par leur structure, leur métabolisme, leur puissance et leur vitesse de contraction. On distingue ainsi des fibres à contraction lente (fibres I) et des fibres à contraction rapide (fibres II - Bottinelli *et al.*, 1991).

La fibre musculaire constitue l'unité de base du muscle strié (figure 26), elle exprime les protéines impliquées dans la contraction et les enzymes indispensables au métabolisme



**Figure 26.** (A) Illustration schématique des niveaux d'organisation du muscle strié squelettique. Celui-ci est composé de cellules musculaires polynucléées (fibres musculaires) exprimant les protéines contractiles. Ces protéines s'agencent en filaments fins (actine, troponine et tropomyosine) et en filaments épais (polymères de 150 à 360 molécules de myosine) qui s'associent pour former les myofilaments. La fixation réversible des filaments fins et épais et leur glissement les uns par rapport aux autres est à l'origine de la contraction musculaire. (B) Molécule de myosine formée de quatre chaînes légères et de deux chaînes lourdes. Ces dernières comprennent une portion hélicoïdale (C-terminale) et une portion globulaire (N-terminale).

énergétique. Les protéines contractiles présentent pour la plupart un polymorphisme. Parmi celles-ci, la myosine, protéine majoritaire du muscle, existe sous plusieurs isoformes et chaque isoforme contient deux chaînes protéiques de hauts poids moléculaires (200 à 220 kDa) appelées chaînes lourdes de myosine (MHC).

Chez les mammifères, les chaînes lourdes de myosine sont divisées en huit classes principales (tableau 6 - Korfage *et al.*, 2005). Leurs expressions respectives varient en fonction du type de muscle et du stade de développement considéré (Pette et Staron, 2000). Les quatre isoformes principales de MHC discernables dans les muscles squelettiques de rat adulte correspondent à trois types "rapides", MHC<sub>2a</sub>, MHC<sub>2x</sub> et MHC<sub>2b</sub>, et à un type "lent", MHC<sub>1</sub> (Bär et Pette, 1988; Schiaffino *et al.*, 1989). Les fibres à MHC<sub>2b</sub> présentent la vitesse de contraction la plus élevée, suivies des fibres à MHC<sub>2x</sub>, des fibres à MHC<sub>2a</sub>, puis des fibres à MHC<sub>1</sub> (Bottinelli *et al.*, 1991). Bien que les mécanismes à l'origine de ces différences soient encore mal compris, ceux-ci impliquent sans doute des variations dans le turnover de l'ATP, c'est-à-dire dans le rapport entre la production et la consommation d'ATP : les fibres de type II génèrent plus rapidement, mais en moindre quantité, l'ATP grâce à leur activité glycolytique mais sont également plus consommatrices d'ATP du fait d'une cinétique d'activation de l'ATP<sub>ase</sub> supérieure à celle des fibres de type I (Sant'Ana Pereira *et al.*, 1996; Polla *et al.*, 2004). Par conséquent, les fibres de type II sont adaptées aux contractions rapides et puissantes mais manquent en revanche d'endurance. Les fibres de type I, moins puissantes mais plus endurantes, sont quant-à-elles caractéristiques des muscles posturaux ou à activité chronique comme le diaphragme (Korfage *et al.*, 2005). Sieck *et al.* (1996) ont ainsi classé les unités motrices en quatre types principaux (tableau 7) :

- *Fibres I (à MHC<sub>1</sub>)* à contraction lente et résistantes à la fatigue
- *Fibres IIA (à MHC<sub>2a</sub>)* à contraction rapide et résistantes à la fatigue
- *Fibres IIX (à MHC<sub>2x</sub>)* à contraction rapide et fatigabilité intermédiaire
- *Fibres IIB (à MHC<sub>2b</sub>)* à contraction rapide mais fatigables.

Ainsi, la grande variabilité de la myosine représente l'un des principaux facteurs de polymorphisme des fibres musculaires (Pette et Staron, 2000). L'abondance relative des différents types de fibres détermine les caractéristiques physiologiques des muscles (Bottinelli *et al.*, 1991; Sieck *et al.*, 1996; Geiger *et al.*, 1999). Ces variations de structure peuvent rendre un muscle plus ou moins fatigable (Geiger *et al.*, 2000).

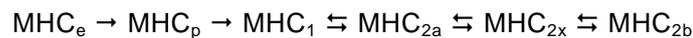
MHC "lentes"	MHC "rapides"
MHC <sub>α</sub> (cardiaque)	MHC <sub>2a</sub>
MHC <sub>1</sub> (squelettique) = MHC <sub>β</sub> (cardiaque)	MHC <sub>2x</sub> = MHC <sub>2d</sub>
MHC <sub>e</sub> (embryonnaire)	MHC <sub>2b</sub>
MHC <sub>p</sub> (périnatale) = MHC <sub>nn</sub> (néonatale)	MHC <sub>eo</sub> (extra-oculaire)

**Tableau 6.** Principaux types d'isoformes de chaînes lourdes de myosine (MHC) identifiés dans les muscles striés des mammifères. *D'après d'Albis et Butler-Browne, 1993.*

Fibres	Lentes (I)		Rapides (II)		
	1	oxydatif / glycolytique	2a	2x	2b
MHC	1	oxydatif / glycolytique	2a	2x	2b
Métabolisme	oxydatif	oxydatif / glycolytique	glycolytique	glycolytique	glycolytique
Résistance à la fatigue	++++	+++	++	++	+
Vélocité de la contraction	+	++	+++	+++	++++
Force spécifique maximale	+	++	+++	+++	++++

**Tableau 7.** Propriétés structurales, métaboliques et contractiles des différents types de fibres musculaires. *Adapté d'après Sieck et Regnier, 2001.*

Les muscles néonataux diffèrent des muscles adultes par leurs propriétés contractiles et leur composition en myosine (Nelson et Thompson, 1994). Les fibres néonatales les plus lentes contiennent de la  $MHC_1$ , les fibres intermédiaires possèdent de la  $MHC_e$  (embryonnaire), de la  $MHC_p$  (périnatale) et de la  $MHC_{2a}$ , et les fibres les plus rapides contiennent de la  $MHC_p$  et de la  $MHC_{2a}$ . La présence de  $MHC_{2x}$  et  $MHC_{2b}$  a néanmoins été décrite au cours du développement périnatal dans certains muscles tels que le diaphragme et le masséter superficiel (Zhan *et al.*, 1998; Usami *et al.*, 2003). La mise en place des caractéristiques contractiles des fibres s'effectue progressivement au cours du développement, plus ou moins rapidement selon les espèces. Le programme de développement de l'expression des différentes isoformes dépend non seulement du type de muscle, mais également des conditions hormonales et environnementales (Whalen *et al.*, 1981). Dans tous les cas, la structure de base et la proportion relative de chaque type de fibre se diversifient après la naissance, permettant l'adaptation de la musculature à la posture et aux mouvements. Les muscles de rat présentent ainsi un phénotype immature à la naissance avant d'exprimer des phases de transition entre les différentes isoformes de MHC selon le schéma général suivant (Pette et Staron, 2000; White *et al.*, 2000) :



Nous avons vu que l'obstruction nasale - et la respiration buccale associée - entraînait des modifications de l'activité électromyographique des muscles des voies aériennes supérieures (cf. introduction générale, p.22). De telles modifications sont connues pour influencer la masse musculaire (Roy *et al.*, 1991). Ainsi, une stimulation électrique quotidienne prévient l'atrophie liée à l'immobilisation chez le lapin (Qin *et al.*, 1997). L'hyperactivité entraîne par ailleurs des transitions vers des isoformes de MHC plus lentes mais plus résistantes à la fatigue (Asmussen *et al.*, 2003). Une activation ou une stimulation électrique de longue durée accroît ainsi la proportion de fibres I au détriment des fibres de type II (Delp et Pette, 1994; Windisch *et al.*, 1998). De plus, une corrélation a été démontrée entre la quantité d'activité musculaire quotidienne et la proportion de fibres de type I (Kernell *et al.*, 1998). À l'inverse, on constate des transitions vers des fibres à contraction rapide lors de périodes d'activité réduite (Edgerton *et al.*, 1995). En cas de dénervation, on observe une diminution des concentrations relatives en  $MHC_1$  et  $MHC_{2b}$  et une augmentation concomitante en  $MHC_{2a}$  et  $MHC_{2x}$  (Huey et Bodine, 1998; Jakubiec-Puka *et al.*, 1999). Ainsi, en l'absence d'innervation, les muscles à contraction rapide deviendraient plus endurants et les muscles posturaux deviendraient moins résistants à la fatigue (Pette et Staron, 2000). Les transitions ne dépendent donc pas uniquement de l'activité neuromusculaire, mais également des propriétés intrinsèques aux

fibres musculaires. De plus, ces transitions peuvent être facilitées, ou au contraire contrecarrées, par le contexte hormonal (Kelly et Goldspink, 1982; Kelly *et al.*, 1985; Butler-Browne *et al.*, 1990).

Les modifications spécifiques de stimulation électrique sont donc susceptibles d'avoir un effet sur l'expression des isoformes de MHC. Etant donné que la composition en MHC détermine les propriétés contractiles des muscles, des variations dans la répartition en isoformes de MHC pourraient être impliquées dans l'adaptation à la respiration buccale. Par conséquent, l'objectif du travail expérimental présenté dans ce chapitre est d'explorer les conséquences de l'obstruction nasale sur le développement des muscles oro-faciaux :

- *Quel est le rythme d'ouverture de la bouche suite à l'obstruction des narines ?*
- *L'obstruction nasale influence-t-elle la masse relative des muscles oro-faciaux ?*
- *L'obstruction nasale modifie-t-elle leur composition en chaînes lourdes de myosine ?*

## 5.1.2 Matériel et méthodes expérimentales

### 5.1.2.1 *Rythme d'ouverture de la bouche*

Les individus des groupes témoins, contrôles et obstruction nasale sont observés quotidiennement du 8<sup>ème</sup> au 21<sup>ème</sup> jour postnatal ( $n = 20$  rats / groupe / âge / sexe). Ces observations sont réalisées entre 9.00h et 12.00h afin de noter le rythme d'ouverture de la bouche en examinant chaque raton 1 min / jour.

### 5.1.2.2 *Prélèvements musculaires*

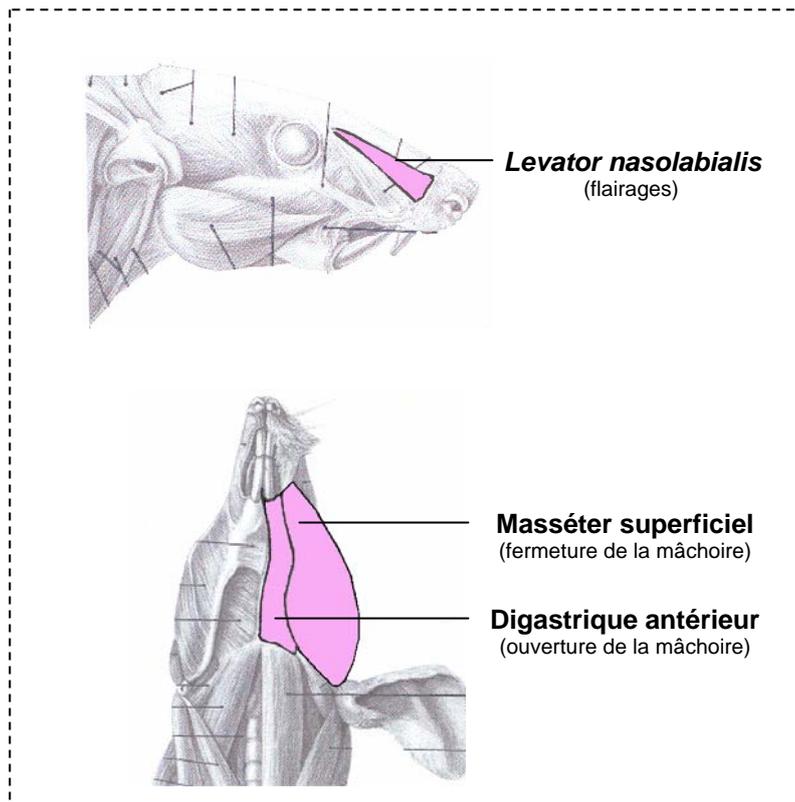
Dans le cadre de notre étude, le **diaphragme** (Dia), muscle inspiratoire principal, est prélevé ainsi que trois muscles oro-faciaux (figure 27) :

- Le **digastrique antérieur** (DA), déprimeur de la mandibule (Spyropoulos *et al.*, 2002).
- Le **masséter superficiel** (MS), propulseur de la mandibule (Van Wessel *et al.*, 2005).
- Le **levator nasolabialis** (LN) lié au flairage et à la respiration nasale (Soucek *et al.*, 1999).

Afin de disposer d'une quantité de protéines suffisantes à l'analyse des chaînes lourdes de myosine, les prélèvements musculaires sont effectués uniquement à J21 ( $n = 8$  rats / groupe / sexe).

### 5.1.2.3 *Extraction et dosage de la myosine*

L'extraction de la myosine est basée sur le protocole décrit par d'Albis *et al.* (1989). Les muscles de même nature sont regroupés par quatre dans des Eppendorfs complétés avec 2 ml de tampon de lavage (tableau 8), ils sont ensuite découpés sur lit de glace avant d'être



**Figure 27.** Muscles oro-faciaux prélevés lors des dissections.  
*Schémas d'après Hebel et Stromberg, 1987.*

centrifugés à 12000 rpm (10 min à 0°C). Après élimination du surnageant, le culot est repris dans trois fois son volume de tampon d'extraction (tableau 8). Les échantillons sont ensuite incubés pendant 30 min au froid et sous agitation puis à nouveau centrifugés à 12000 rpm (10 min à 0°C). Le surnageant, contenant la myosine, est dilué par deux dans du glycérol à 87% puis conservé à -18°C jusqu'à la réalisation du dosage.

Le dosage de la myosine est basé sur la technique de Bradford modifiée (Coomassie Protein Assay Reagent G-250, Laboratoires Pierce). Ce dosage est effectué en vue de déposer une quantité égale de protéine (2,5 µg) dans chacun des puits d'électrophorèse. Après extraction de la myosine, 10 µl de surnageant contenant l'extrait protéique sont prélevés et dilués au 5<sup>ème</sup> dans du tampon de dilution (10 ml de tampon d'extraction, 10 ml de glycérol à 87%, eau distillée qsp 100 ml). Cinq tubes d'hémolyse reçoivent successivement 10 µl d'échantillon dilué et 2,5 ml de réactif de Bradford. Chaque tube est homogénéisé puis laissé au repos pendant 1 min à température ambiante. La densité optique à 595 nm de chaque échantillon est alors mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre (Beckman DU 640B) afin de déterminer la concentration en myosine totale (chaînes lourdes et chaînes légères). Celle-ci est calculée en fonction d'une courbe étalon pré-établie avec des échantillons contenant des concentrations connues et croissantes de protéines.

#### *5.1.2.4 Analyses des chaînes lourdes de myosine*

La composition en chaînes lourdes de myosine est déterminée à l'aide d'une électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de dodécylsulfate de sodium (SDS-PAGE) selon la technique décrite par Talmadge et Roy (1993), avec quelques modifications apportées par Janmot et d'Albis (1994). Cette technique permet de séparer les protéines en fonction de leurs poids moléculaires. En effet, le dodécylsulfate de sodium, molécule chargée négativement, s'associe aux protéines en formant un complexe dont la charge négative dépend uniquement de la longueur de la chaîne protéique. Les protéines les plus grosses étant ralenties par le gel, celles-ci se répartissent alors le long du trajet de migration en fonction de leurs poids moléculaires.

Un gel de séparation à 12,5% d'acrylamide (tableau 9) est coulé sur 5 cm entre les deux plaques de verre d'une mini-cuve Biorad (Mini-protean II). Après polymérisation de celui-ci, un gel de concentration à 5% d'acrylamide est coulé à son tour de façon à remplir totalement l'espace situé entre les plaques. Les échantillons biologiques sont dilués dans du tampon de dilution (tableau 9) afin d'obtenir une concentration en protéines de 2,5 µg / 10 µl d'échantillon. Ce tampon contient du β-mercapto-éthanol qui dénature les protéines en rompant les ponts disulfures. Les extraits sont ensuite placés 5 min dans un bain

Tampons	Quantité
<b>de lavage :</b>	
20 mM de NaCl	200 µl de 1 M
5 mM de PO <sub>4</sub> <sup>-</sup>	5,3 mg de PO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> Na et 5,7 mg de PO <sub>4</sub> HNa <sub>2</sub>
1 mM de EGTA	50 µl de 0,2M à pH=7 qsp 10 ml
<b>d'extraction :</b>	
100 mM de PPI <sub>Na</sub>	10 µl de 0,1 M à pH=8,5
5 mM de EGTA	250 µl de 0,2 M
1 mM de DTT	40 µl de 0,25M à pH=8,4 qsp 10 ml

**Tableau 8.** Composition des tampons de lavage des muscles et d'extraction de la myosine. *D'après d'Albis et al., 1989.*

Gels de séparation	Quantité	Gels de concentration	Quantité
Glycérol à 87%	4,3 g	Glycérol 87%	2,15 g
Acrylamide 30% Bis 0,6%	2,667 ml	Acrylamide 30% Bis 0,02%	0,7 ml
Tris 1,5M, pH=8,8	1,333 ml	Tris 0,5M pH=6,7	0,7 ml
Glycine 1M	1 ml	EDTA 100mM pH=7	0,2 ml
H <sub>2</sub> O	1 ml	SDS 10%	0,2 ml
SDS 10%	0,4 ml	H <sub>2</sub> O	1,45 ml
<i>Homogénéiser</i>		<i>Homogénéiser</i>	
Persulfate d'ammonium 10%	0,4 ml	Persulfate d'ammonium 10%	50 µl
<i>Homogénéiser</i>		<i>Homogénéiser</i>	
Temed	5 µl	Temed	5 µl

**Tableau 9.** Composition des gels d'électrophorèse. *D'après Talmadge et Roy, 1993.*

marie à 100°C et les deux tampons de migration sont placés dans la cuve d'électrophorèse (tableau 10).

10 µl d'extrait protéique sont déposés dans chaque puits d'électrophorèse et la migration à 70 V se déroule pendant 28h dans une chambre froide (4°C). Dès la fin de l'électrophorèse, les gels sont colorés au bleu de Coomassie (1h) puis plongés successivement dans deux solutions de décoloration (30 min puis une nuit - tableau 11). La détermination des bandes protéiques est réalisée en déposant un marqueur de MHC (diaphragme de rat adulte - Asmussen *et al.*, 2003) dans chacun des gels. La quantité relative des différentes bandes protéiques est mesurée à l'aide d'un scanner (Biorad GS-800) et analysée avec le logiciel Quantity one 4.2.1 au Laboratoire des Biosciences de l'Aliment (LBSA - Faculté des Sciences Nancy 1, UHP - UC885 INRA). Les résultats sont exprimés en pourcentage des différentes isoformes de chaînes lourdes de myosine.

#### 5.1.2.5 Analyses statistiques

Toutes les variables sont analysées par une ANOVA à deux facteurs (sexe \* traitement) suivie du test PLSD de Fischer pour comparer les moyennes spécifiques de chaque groupe expérimental.

### 5.1.3 Résultats

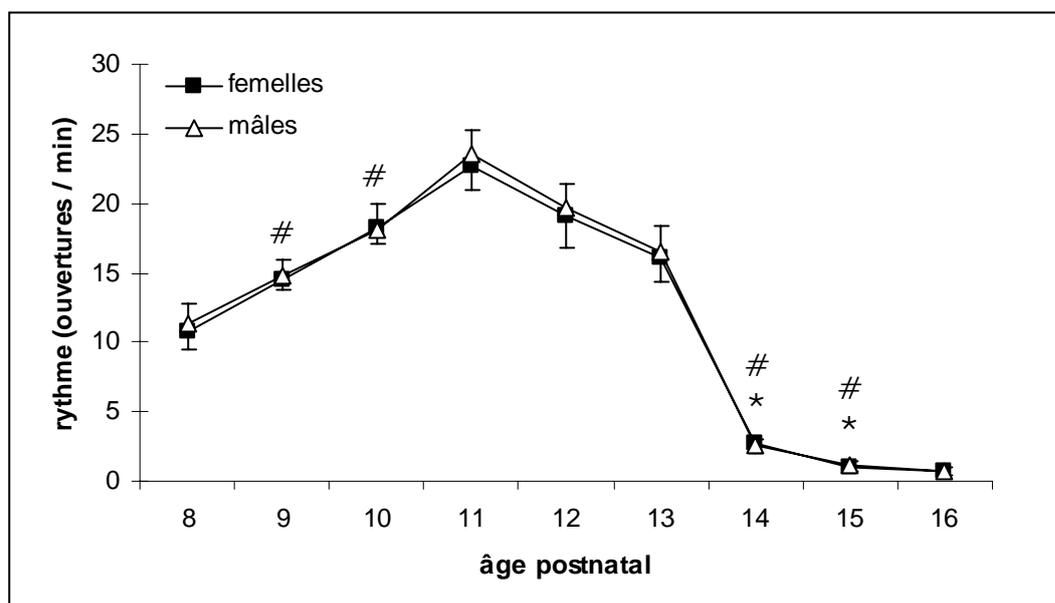
#### 5.1.3.1 Obstruction nasale et rythme d'ouverture de la bouche

L'obstruction des narines se traduit par une ouverture périodique de la bouche qui se met en place dès le 8<sup>ème</sup> jour postnatal (figure 28). Le rythme d'ouverture de la bouche augmente progressivement jusqu'au 11<sup>ème</sup> jour postnatal, jour auquel il atteint son maximum (environ 23 ouvertures de la bouche par minute). Les différences quotidiennes ne sont cependant pas significatives chez les mâles (de J8 à J9 :  $t = 2,25$ ;  $p = 0,034$  chez les femelles;  $t = 1,76$ ;  $p = 0,101$  chez les mâles. De J9 à J10 :  $t = 2,66$ ;  $p = 0,014$  chez les femelles;  $t = 1,76$ ;  $p = 0,101$  chez les mâles). A partir de J11, le rythme d'ouverture de la bouche décline graduellement avant de chuter brutalement le 14<sup>ème</sup> jour postnatal (comparativement à J13 :  $t = 6,79$ ;  $p = 0,0001$  chez les femelles;  $t = 5,80$ ;  $p = 0,0004$  chez les mâles). Il continue à baisser de manière significative à J15 (comparativement à J14 :  $t = 2,46$ ;  $p = 0,039$  chez les femelles;  $t = 3,04$ ;  $p = 0,016$  chez les mâles) puis se stabilise aux alentours d'une ouverture de la bouche par minute à partir du 16<sup>ème</sup> jour postnatal. A noter que tout au long de la période d'observation, les individus témoins et contrôles réalisent moins de deux ouvertures de la bouche par minute (moins de 0,5 ouvertures/min à partir de J13). Que ce soit chez les femelles ou chez les mâles, la différence est

Tampons	Quantité	Solutions	Proportions
<b>de dilution :</b>		<b>de coloration (1h) :</b>	
tris HCl 0,5M pH=6,8	6,25 ml	éthanol pur	50 %
glycérol à 100%	5 ml	acide acétique	10 %
β-mercapto-éthanol	1,25 ml	bleu de coomassie R-250	0,2 %
EDTA 0,2M pH=7	0,125 ml	eau distillée	qsp 300 ml
SDS à 10%	12,5 ml		
bleu de Bromophénol	qq grains		
<b>intérieur :</b>		<b>de décoloration :</b>	
Glycine 150 mM	11,25 g	<b>solution 1 (30 min) :</b>	
tris 0,1M	12,1 g	éthanol pur	30 %
SDS 0,1%	1 g	acide acétique	10 %
eau distillée	qsp 1litre	eau distillée	qsp 300 ml
<b>extérieur :</b>		<b>solution 2 (une nuit) :</b>	
tampon intérieur		éthanol pur	5 %
dilué au 1/2		acide acétique	5 %
		eau distillée	qsp 300 ml

**Tableau 10.** Composition des tampons d'électrophorèse. D'après Talmadge et Roy, 1993.

**Tableau 11.** Composition des solutions de coloration et de décoloration des gels d'électrophorèse. D'après Talmadge et Roy, 1993.



**Figure 28.** Rythme d'ouverture de la bouche chez les animaux exposés à l'obstruction nasale.  $n = 20$  rats / âge / sexe. #, significativement différent de l'âge précédent chez les femelles; \*, significativement différent de l'âge précédent chez les mâles. Analyse du test t de Student (échantillons appariés), J8 à J9 :  $t = 2,25$ ;  $p = 0,034$  chez les femelles. J9 à J10 :  $t = 2,66$ ;  $p = 0,014$  chez les femelles. J13 à J14 :  $t = 6,79$ ;  $p = 0,0001$  chez les femelles;  $t = 5,80$ ;  $p = 0,0004$  chez les mâles. J14 à J15 :  $t = 2,46$ ;  $p = 0,039$  chez les femelles;  $t = 3,04$ ;  $p = 0,016$  chez les mâles.

significative avec les animaux exposés à l'obstruction nasale du 8<sup>ème</sup> au 15<sup>ème</sup> jour postnatal ( $3,42 < F < 56,51$ ;  $0,0001 < p < 0,042$ ).

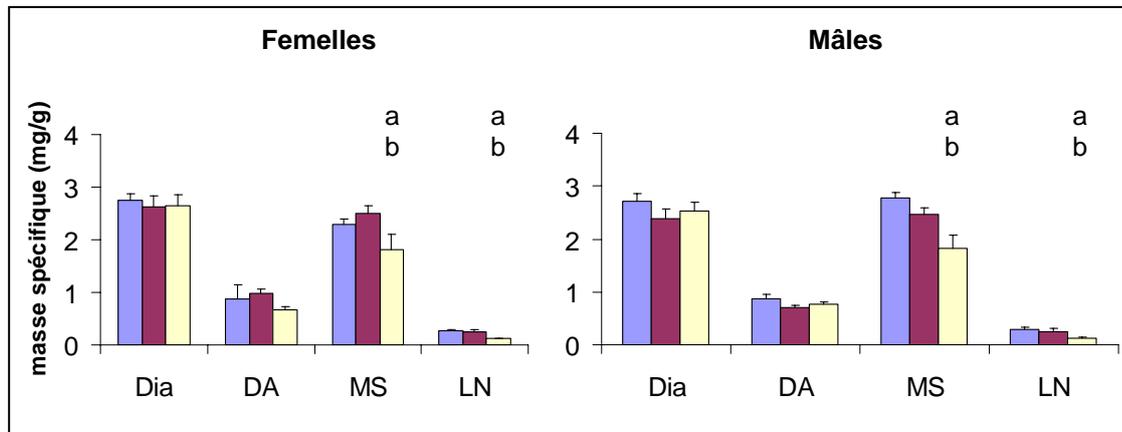
### 5.1.3.2 Obstruction nasale et développement des muscles oro-faciaux

**Masse musculaire.** La figure 29 montre qu'à 21 jours, les masses spécifiques du diaphragme et du digastrique antérieur ne sont pas modifiées par l'obstruction nasale (respectivement  $F = 1,31$ ,  $p = 0,287$  et  $F = 1,13$ ,  $p = 0,364$ ). L'induction d'une obstruction nasale à J8 entraîne néanmoins une atrophie du masséter superficiel et du *levator nasolabialis* à J21 (respectivement  $F = 5,40$ ,  $p = 0,001$  et  $F = 4,79$ ,  $p = 0,003$ ). En effet, le passage à la respiration buccale est associé à une diminution de la masse du masséter superficiel et du *levator nasolabialis* aussi bien chez les femelles (MS :  $p = 0,045$  vs témoins,  $p = 0,011$  vs contrôles; LN :  $p = 0,023$  vs témoins,  $p = 0,027$  vs contrôles) que chez les mâles (MS :  $p = 0,0005$  vs témoins,  $p = 0,032$  vs contrôles; LN :  $p = 0,004$  vs témoins,  $p = 0,008$  vs contrôles). Il n'existe par ailleurs aucune différence significative entre les individus témoins et contrôles en ce qui concerne la masse spécifique des muscles étudiés ( $0,084 < p < 0,819$ ).

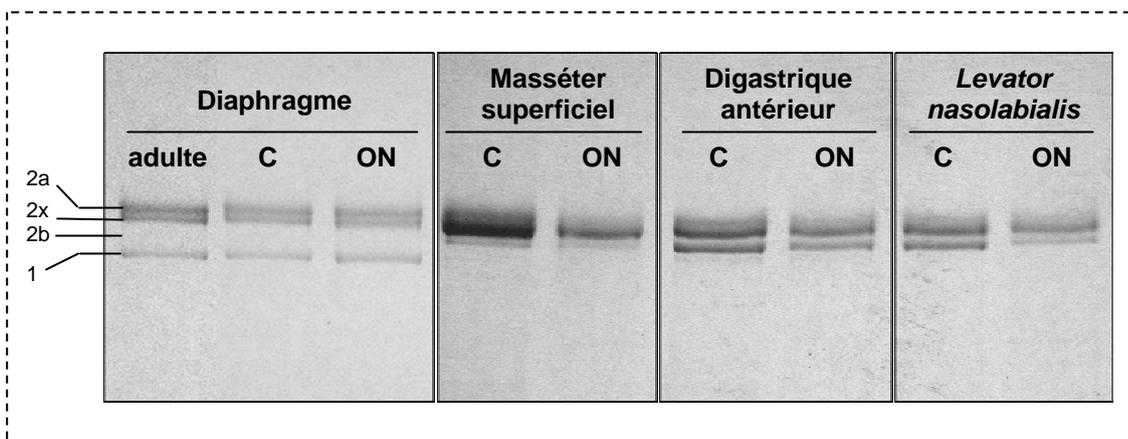
**Composition en chaînes lourdes de myosine.** Des exemples de gels d'électrophorèse sont présentés dans la figure 30 et les résultats de l'analyse densitométrique sont résumés dans la figure 31 (au verso).

À 21 jours et quel que soit le traitement, seules des isoformes adultes ont été détectées. En effet, les diaphragmes sont exclusivement composés d'isoformes 2a, 2x et 1 alors que seules les isoformes 2a, 2x et 2b ont été observées dans les muscles oro-faciaux. La MHC<sub>2x</sub> est l'isoforme la plus abondante en terme d'expression relative dans le digastrique antérieur, le masséter superficiel et le *levator nasolabialis* tandis qu'il n'existe aucune isoforme prédominante dans le diaphragme.

En ce qui concerne le diaphragme, aucune différence significative n'est détectée pour la composition relative en isoformes de MHC entre les différents groupes expérimentaux (MHC<sub>1</sub> :  $F = 1,47$ ,  $p = 0,211$ ; MHC<sub>2a</sub> :  $F = 1,22$ ,  $p = 0,307$ ; MHC<sub>2x</sub> :  $F = 0,89$ ,  $p = 0,493$ ). Dans le digastrique antérieur, associé à l'ouverture de la bouche, le passage à la respiration buccale entraîne une diminution relative de la MHC<sub>2b</sub> chez les mâles ( $p = 0,048$  vs témoins;  $p = 0,002$  vs contrôles) alors qu'il n'existe aucune différence significative chez les femelles ( $0,089 < p < 0,807$ ). Dans le masséter superficiel, lié à la fermeture de la mâchoire, la respiration buccale est associée à une diminution de l'expression relative de la MHC<sub>2b</sub> aussi bien chez les mâles ( $p = 0,032$  vs témoins;  $p = 0,024$  vs contrôles) que chez les femelles ( $p < 0,0001$  vs témoins et contrôles). Chez ces dernières,

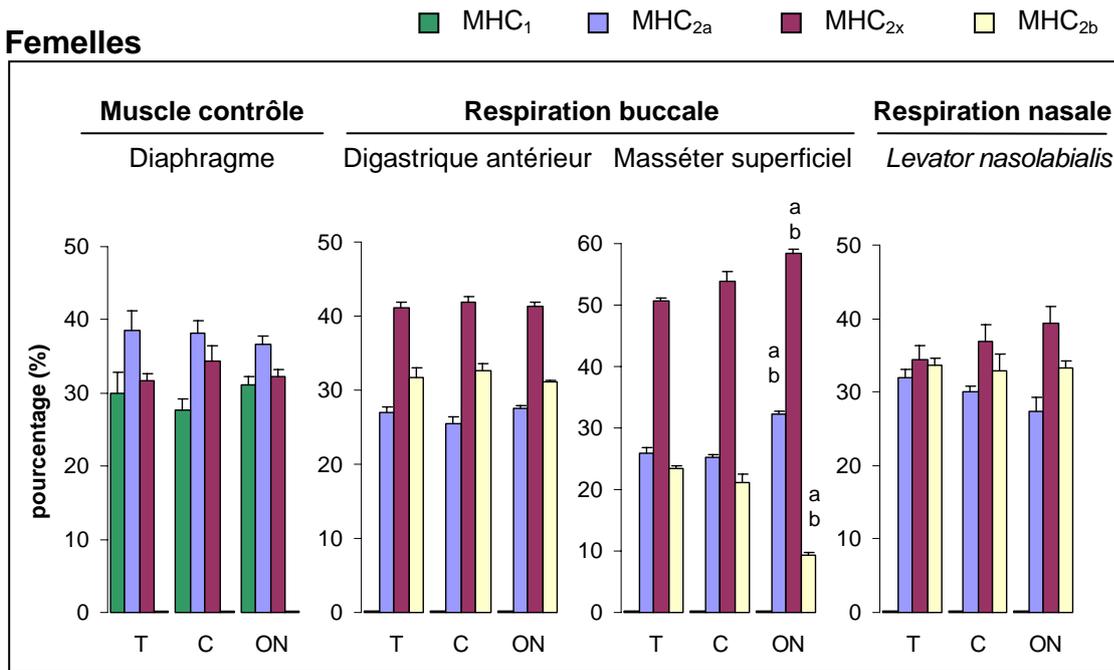


**Figure 29.** Masses spécifiques du diaphragme (Dia), du digastrique antérieur (DA), du masséter superficiel (MS) et du *levator nasolabialis* (LN) à 21 jours chez les animaux témoins (■), contrôles (■) et obstruction nasale (■).  $m \pm \text{SEM}$ .  $n = 8$  rats / groupe / sexe. Analyse de l'ANOVA à 2 facteurs (effet traitement), MS :  $F = 5,40$  à 2 degrés de liberté,  $p = 0,001$ ; LN :  $F = 4,72$  à 2 degrés de liberté,  $p = 0,003$ . Analyse du PLSD de Fisher, <sup>a</sup>  $p < 0,05$  comparé aux témoins; <sup>b</sup>  $p < 0,05$  comparé aux contrôles.

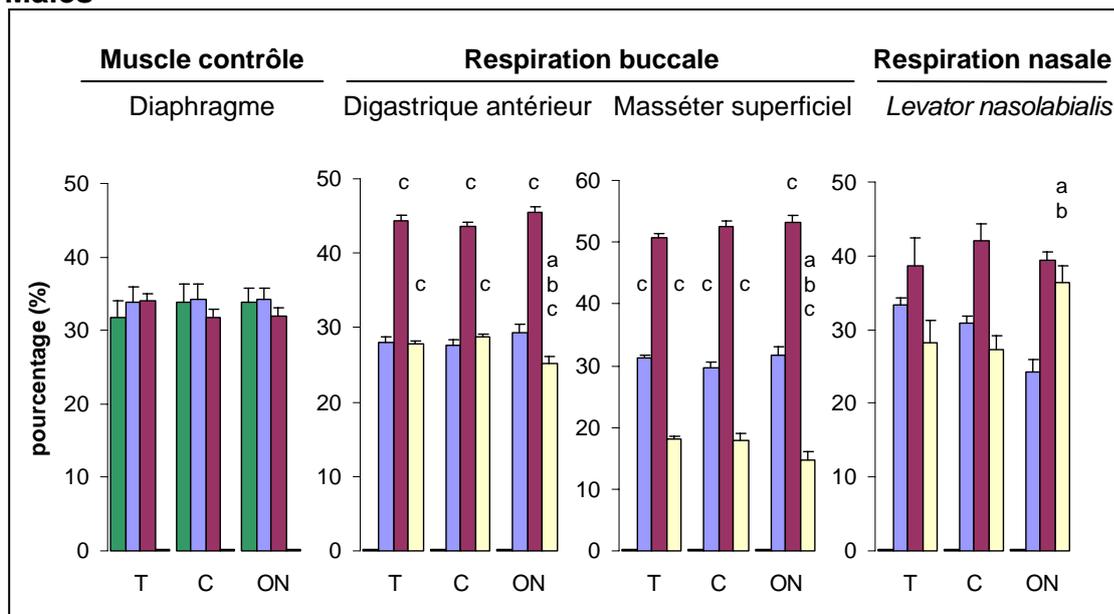


**Figure 30.** Exemple de gels d'électrophorèse obtenus à partir d'extraits musculaires d'individus femelles issus des groupes contrôle (C) et obstruction nasale (ON). Les dépôts sont effectués en duplicata. La détermination des bandes est effectuée à l'aide d'un diaphragme adulte dont la composition en MHC est connue (2a, 2x, 1). Les muscles sont poolés ( $n = 4$  muscles / extrait) afin d'obtenir une quantité de protéine suffisante. Deux séries d'électrophorèse ont été effectuées ( $n = 8$  rats / sexe / groupe).

## Femelles



## Mâles



**Figure 31.** Composition relative en chaînes lourdes de myosine du diaphragme, du digastrique antérieur, du masséter superficiel et du *levator nasolabialis* à 21 jours chez les animaux témoins (T), contrôles (C) et obstruction nasale (ON).  $m \pm \text{SEM}$ .  $N = 2$  extraits musculaires / groupe / sexe ( $n = 8$  rats / groupe / sexe). Analyse de l'ANOVA à 2 facteurs (effet traitement), digastrique antérieur, MHC<sub>2x</sub> :  $F = 5,99$  à 2 degrés de liberté,  $p < 0,0001$ ; MHC<sub>2b</sub> :  $F = 12,11$  à 2 degrés de liberté,  $p < 0,0001$ ; masséter superficiel, MHC<sub>2a</sub> :  $F = 12,17$  à 2 degrés de liberté,  $p < 0,0001$ ; MHC<sub>2x</sub> :  $F = 7,08$  à 2 degrés de liberté,  $p < 0,0001$ ; MHC<sub>2b</sub> :  $F = 21,49$  à 2 degrés de liberté,  $p < 0,0001$ ; levator nasolabialis, MHC<sub>2a</sub> :  $F = 5,08$  à 2 degrés de liberté,  $p = 0,0005$ ; MHC<sub>2b</sub> :  $F = 2,98$  à 2 degrés de liberté,  $p = 0,0171$ . Analyse du PLSD de Fisher, <sup>a</sup>  $p < 0,05$  comparé aux témoins; <sup>b</sup>  $p < 0,05$  comparé aux contrôles; <sup>c</sup>  $p < 0,05$  comparé aux homologues femelles.

cette diminution se fait à l'avantage de la MHC<sub>2a</sub> ( $p < 0,0001$  vs témoins et contrôles) et de la MHC<sub>2x</sub> ( $p < 0,0001$  vs témoins;  $p = 0,002$  vs contrôles). En ce qui concerne le *levator nasolabialis*, associé à la respiration nasale et au comportement de flairage, on observe une augmentation relative de la MHC<sub>2b</sub> ( $p = 0,009$  vs témoins;  $p = 0,001$  vs contrôles) au détriment de la MHC<sub>2a</sub> ( $p < 0,0001$  vs témoins;  $p = 0,001$  vs contrôles) uniquement chez les mâles ( $0,066 < p < 0,923$  chez les femelles). Quels que soit le muscle et l'isoforme considérés, il n'existe par ailleurs aucune différence significative entre les individus témoins et contrôles ( $0,072 < p < 0,905$ ).

D'autre part, des différences significatives sont détectées entre les sexes pour le digastrique antérieur et le masséter superficiel. Pour le digastrique antérieur, les individus mâles présentent une expression relative de la MHC<sub>2x</sub> supérieure (témoins :  $p = 0,010$ ; contrôles :  $p = 0,050$ ; obstruction nasale :  $p < 0,0001$ ). Cette augmentation se fait au détriment de l'expression relative de la MHC<sub>2b</sub> (témoins :  $p = 0,006$ ; contrôles :  $p = 0,0007$ ; obstruction nasale :  $p < 0,0001$ ). En ce qui concerne le masséter superficiel, les différences inter-sexuelles sont en revanche inversées entre les individus témoins et contrôles d'une part; et les animaux exposés à l'obstruction nasale d'autre part. Ainsi, chez les mâles témoins et contrôles, l'expression relative de la MHC<sub>2b</sub> est inférieure à celle de leurs homologues femelles (témoins :  $p = 0,010$ ; contrôles :  $p = 0,032$ ). Cette différence se fait à l'avantage de la MHC<sub>2a</sub> (témoins :  $p = 0,002$ ; contrôles :  $p = 0,0004$ ). À l'inverse, les mâles exposés à l'obstruction nasale affichent une expression relative de la MHC<sub>2b</sub> supérieure à leurs homologues femelles ( $p = 0,0003$ ). Cette différence se fait au détriment de la MHC<sub>2x</sub> ( $p = 0,0005$ ).

#### 5.1.4 Résumé

L'obstruction nasale est associée à la mise en place d'une suppléance buccale permettant de maintenir la fonction ventilatoire. La respiration buccale nouvellement établie se traduit par une ouverture périodique de la bouche. Le nombre d'ouverture par minute augmente progressivement jusqu'au 11<sup>ème</sup> jour postnatal, jour correspondant à un taux de mortalité maximal. Le rythme d'ouverture de la bouche diminue ensuite de façon graduelle avant de chuter brutalement à J14, jour de la réouverture des narines.

Ces perturbations comportementales sont associées à des modifications de la masse et de la structure des muscles oro-faciaux. On constate ainsi une diminution de la croissance du masséter superficiel et du *levator nasolabialis* alors que les masses spécifiques du diaphragme et du digastrique antérieur ne sont pas modifiées. D'autre part, Quel que soit le groupe expérimental et le muscle considérés, seules des isoformes de MHC caractéristiques d'individus adultes ont été observées à 21 jours. L'obstruction nasale

et l'ouverture chronique de la bouche entraînent des modifications de la répartition en isoformes de MHC dans tous les muscles oro-faciaux étudiés chez les mâles et uniquement dans le masséter superficiel chez les femelles.

## **5.2 Obstruction nasale, prise alimentaire et croissance**

*Associé aux résultats sur le comportement maternel, le travail expérimental présenté dans cette partie a donné lieu à la rédaction d'un article soumis à la revue "Physiology and Behavior" et intitulé "Maternal behavior and offspring's development under early nasal obstruction in rats". Cet article est présenté en annexe 3.*

### 5.2.1 Introduction

La croissance correspond à l'augmentation des dimensions de l'organisme. Ce phénomène concerne essentiellement les individus juvéniles et résulte d'interactions complexes entre des facteurs génétiques, comportementaux et environnementaux. La croissance implique la modification de paramètres quantitatifs (poids, mesures morphométriques...) et qualitatifs (maturation des tissus). Elle se poursuit sans interruption de l'activité fonctionnelle et dépend fortement du contexte hormonal : hormone de croissance, hormones thyroïdiennes, hormones sexuelles, glucocorticoïdes... Avec la dépense énergétique (métabolisme de base, activité physique...), la prise alimentaire est l'un des principaux régulateurs de la croissance.

Chez le rat en développement, le comportement alimentaire est fortement dépendant des signaux chimiques en provenance de la mère. Ainsi, le bisulfite diméthyle est une phéromone maternelle attractive pour le jeune (Blass et Teicher, 1980). À l'origine, cette molécule est présente dans le liquide amniotique maternel et elle est ingérée par la mère au moment de la parturition. Pendant sa toilette, la mère dépose la phéromone sur ses mamelles et attire ainsi les jeunes dès la naissance. Après la première tétée, le bisulfite diméthyle se retrouve dans la salive du jeune qui le dépose à son tour à chaque tétée sur les mamelles maternelles qui restent ainsi attractives. Singh et Tobach (1975) puis Risser et Slotnick (1987) ont montré que la bulbectomie olfactive bilatérale entraîne des difficultés à s'orienter vers les mamelles, une diminution du taux d'attachement aux mamelles et un retard de croissance. On peut donc supposer qu'en cas d'obstruction nasale bilatérale, la compétition entre les processus respiratoire et alimentaire pourrait constituer un facteur renforçant les impacts de la privation olfactive sur l'alimentation. Cette compétition pourrait notamment perturber la saisie orale des mamelles et limiter le rythme d'ingestion du lait maternel.

Par conséquent, l'objectif du travail expérimental présenté dans cette partie est de répondre aux questions suivantes :

- *L'obstruction nasale précoce perturbe-t-elle la prise alimentaire ?*
- *Ces perturbations éventuelles se traduisent-elles par un retard de croissance ?*

## 5.2.2 Matériel et méthodes expérimentales

### 5.2.2.1 *Prise alimentaire*

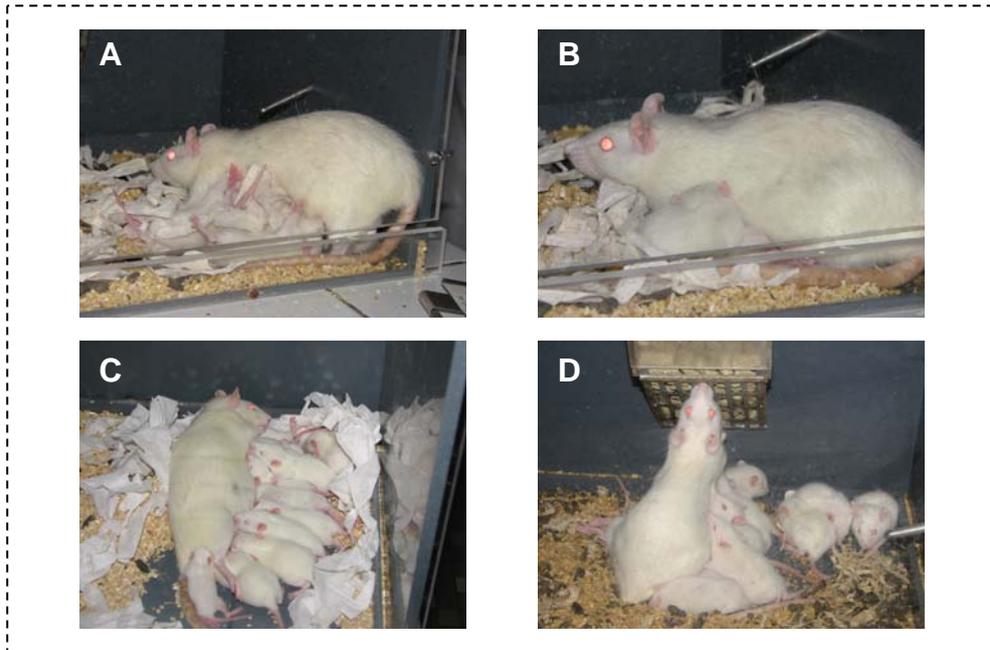
Au cours de la dernière semaine de gestation, les mères *prepartum* sont placées dans des cages expérimentales identiques à celles utilisées pour examiner le comportement maternel (cf. chapitre 3, p.40). Les mères sont nourries et abreuvées *ad libitum* durant toute la durée de l'étude et la litière des cages est remplacée par de la sciure propre une fois par semaine. Le comportement alimentaire de la progéniture est observé à J9, J15 et J21 ( $n = 5$  portées / âge / groupe). Toutes les observations comportementales sont effectuées durant la phase nocturne entre 09.00 h et 12.00 h. Les cages expérimentales sont maintenues dans la même position tout au long de l'étude.

Dans un premier temps, la mère est retirée du dispositif pendant 2 h (de 09.00 h à 11.00 h) afin de garantir l'attractivité des mamelles au moment de la période d'observation. À la fin de cette période de séparation, seuls trois femelles et trois mâles sont remis en présence de la mère. Cette limitation temporaire de la taille des portées vise à éluder tout problème de compétition dans l'accès aux mamelles. Les jeunes retirés du dispositif sont maintenus en présence de sciure du nid et leur région ano-génitale est frottée périodiquement afin de limiter l'impact de cette séparation maternelle additionnelle (Van Oers *et al.*, 1999). À 11.00 h, la mère est remise dans le dispositif et le comportement alimentaire est observé en continu de 11.00 h à 12.00 h.

Un évènement alimentaire est comptabilisé comme tel à partir du moment où au moins un jeune saisi une mamelle pour une durée minimum d'une minute et ce, quelle que soit la posture adoptée par la mère (figure 32). Les paramètres pris en compte sont :

- Le temps écoulé avant le premier évènement alimentaire (ou latence).
- Le nombre total d'évènements alimentaires.

De plus, pour chacun de ces évènements, la durée de l'allaitement et le nombre maximal de rats accédant simultanément aux mamelles (ou taux d'attachement aux mamelles) sont notés.



**Figure 32.** Postures d'allaitement prises en compte lors de l'évaluation du comportement alimentaire. La mère peut changer de posture au cours d'un même évènement alimentaire et passer par exemple (A) d'une posture de cyphose, caractérisée par un dos arqué et un appui marqué sur les pattes arrières, à une position plus appuyée sur la portée (B). Lorsque la portée atteint une certaine taille, la mère peut s'installer en décubitus latéral (C). À l'approche du sevrage, les jeunes stimulent la mère pour accéder aux mamelles, on parle alors d'allaitements passifs (D). *Photographies réalisées au laboratoire.*

### 5.2.2.2 Bol alimentaire

Lors des dissections ( $n = 8$  rats / groupe / âge / sexe), le contenu de l'estomac est prélevé et pesé afin d'évaluer la prise alimentaire. Fukushima *et al.* (2004) ont en effet montré que le contenu de l'estomac constituait un indice fiable de la quantité de lait ingéré. La masse mesurée est rapportée à la masse corporelle de l'individu afin d'étudier, sur une même échelle de comparaison, la prise alimentaire dans chacun des lots expérimentaux.

### 5.2.2.3 Paramètres de la croissance

Afin de vérifier si l'obstruction nasale précoce a un impact sur les paramètres de la croissance, des jeunes individualisés ( $n = 20$  rats / groupe / âge / sexe) sont pesés et mesurés tous les trois jours à partir du 9<sup>ème</sup> jour postnatal (J9, J12, J15, J18 et J21). La longueur des animaux est mesurée du museau à la base de la queue à l'aide d'un pied à coulisse (figure 33). Les gains pondéral et longitudinal sont calculés pendant et après la période d'obstruction nasale.

### 5.2.2.3 Analyses statistiques

À l'exception des données sur la croissance, toutes les variables sont analysées par une ANOVA à deux facteurs (sexe \* traitement) suivie du test PLSD de Fischer pour comparer les moyennes spécifiques de chaque groupe expérimental.

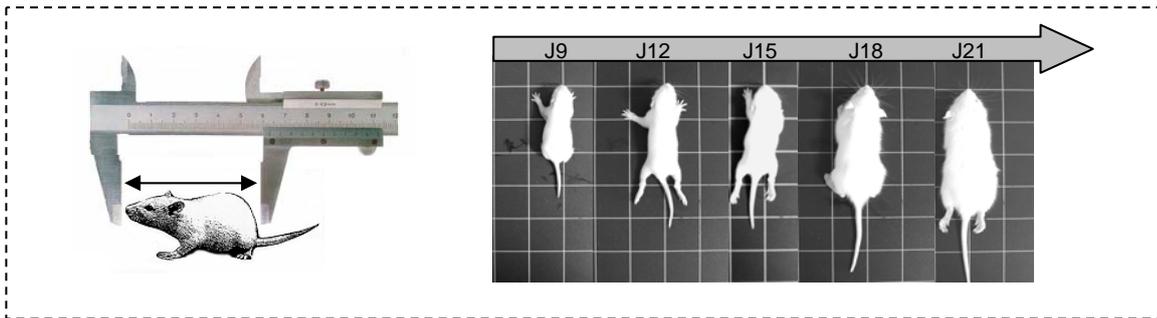
Pour les données sur la croissance, l'analyse statistique est réalisée au moyen d'une ANOVA à trois facteurs (sexe \* traitement \* âge) suivi par le test de Bonferroni/Dunn à comparaisons multiples.

Les différences sont considérées significatives à partir de  $p < 0,05$  (valeur corrigée à  $p < 0,0033$  pour le test de Bonferroni/Dunn).

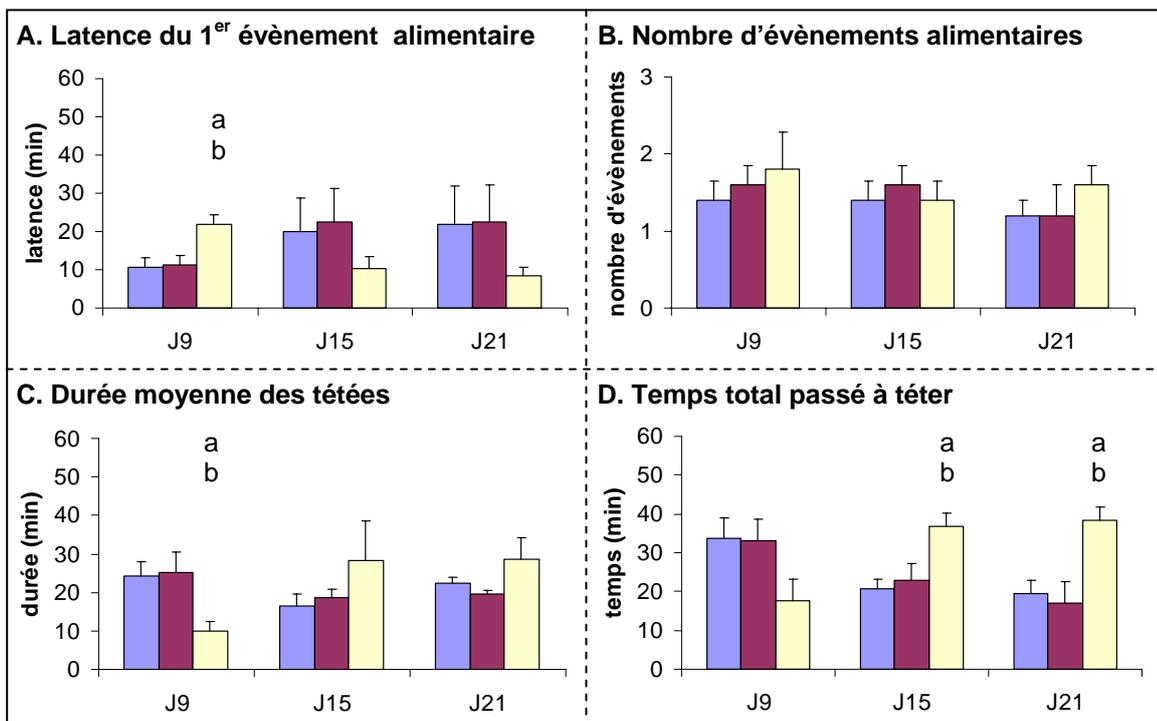
## 5.2.3 Résultats

### 5.2.3.1 Obstruction nasale et prise alimentaire

**Comportement alimentaire.** La figure 34 montre qu'il y a des différences significatives à J9 pour la latence du premier évènement alimentaire (figure 34A -  $H = 6,62$ ,  $p = 0,037$ ) et pour la durée moyenne des évènements alimentaires (figure 34C -  $H = 10,09$ ,  $p = 0,006$ ). À 15 et 21 jours, seul le temps total passé à téter (figure 34D) diffère de manière significative selon le groupe expérimental (J15 :  $H = 6,66$ ,  $p = 0,036$ ; J21 :  $H = 8,18$ ,  $p = 0,017$ ). En revanche, quel que soit l'âge considéré, le nombre total d'évènements (figure 34B)



**Figure 33.** Mesures morphométriques effectuées sur les animaux expérimentaux à J9, J12, J15, J18 et J21. J : jour postnatal. (A) La longueur des animaux est mesurée du museau à la base de la queue à l'aide d'un pied à coulisse. (B) Croissance des animaux du 9<sup>ème</sup> au 21<sup>ème</sup> jour postnatal. Photographies réalisées au laboratoire.

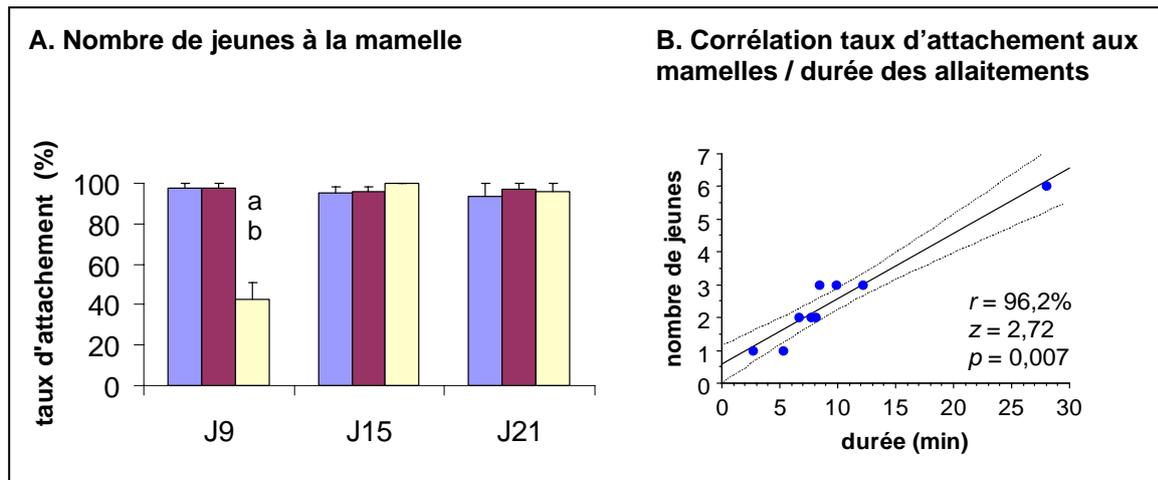


**Figure 34.** Comportement alimentaire à 9, 15 et 21 jours chez les animaux témoins (■), contrôles (■) et obstruction nasale (■). (A) Latence du premier évènement alimentaire, (B) nombre d'évènements alimentaires, (C) durée moyenne des tétées et (D) temps total passé à téter.  $n = 5$  portées / groupe / âge. J : jour postnatal. Analyse du Kruskal-Wallis, latence J9 :  $H = 6,62$  et  $p = 0,037$ ; durée moyenne J9 :  $H = 10,09$  et  $p = 0,006$ ; durée totale J15 :  $H = 6,66$  et  $p = 0,036$ ; durée totale J21 :  $H = 8,18$  et  $p = 0,017$ . Analyse du test U de Mann-Withney, <sup>a</sup>  $p < 0,05$  comparé aux portées témoins; <sup>b</sup>  $p < 0,05$  comparé aux portées contrôles.

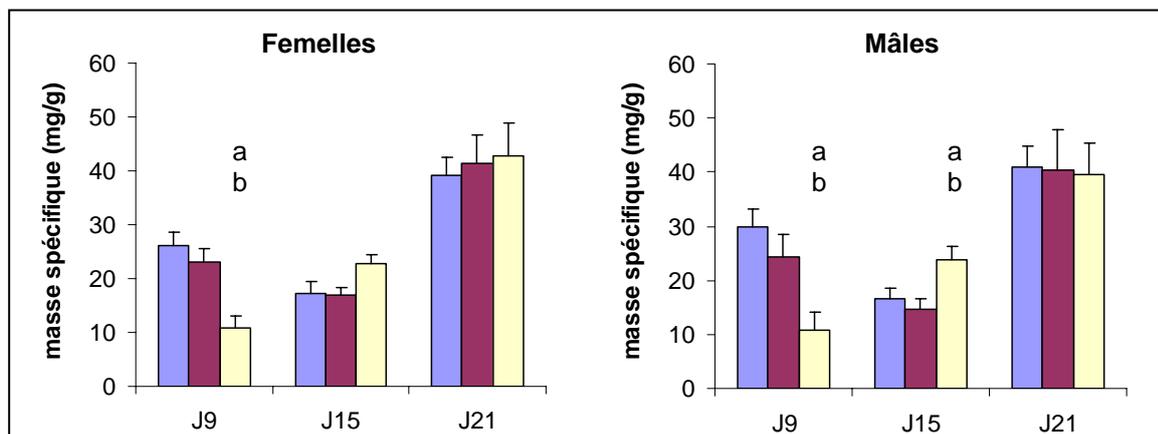
est comparable entre les individus témoins, contrôles et obstruction nasale ( $0,50 < H < 1,42$  et  $0,493 < p < 0,779$ ). Vingt-quatre heures après la cautérisation, la latence du premier événement alimentaire est ainsi significativement plus importante dans les portées exposées à l'obstruction nasale ( $p = 0,03$  vs témoins et contrôles). Celles-ci présentent en outre une réduction de la durée moyenne des tétées comparées aux portées témoins ( $p = 0,007$ ) et contrôles ( $p = 0,009$ ). À partir du 15<sup>ème</sup> jour postnatal, les portées exposées à l'obstruction nasale passent significativement plus de temps à téter que les portées témoins (J15 :  $p = 0,02$ ; J21 :  $p = 0,009$ ) et contrôles (J15 :  $p = 0,05$ ; J21 :  $p = 0,03$ ), bien que la durée moyenne (J15 :  $H = 5,43$ ,  $p = 0,07$ ; J21 :  $H = 2,74$ ,  $p = 0,26$ ) et la latence (J15 :  $H = 0,56$ ,  $p = 0,76$ ; J21 :  $H = 3,27$  et  $p = 0,20$ ) des événements alimentaires ne soient pas statistiquement différents.

La figure 35A montre que le taux maximal d'attachement aux mamelles est également affecté par le traitement expérimental à J9 ( $H = 14,73$ ,  $p = 0,0006$ ), alors qu'il n'y a aucune différence significative à J15 ( $H = 2,21$ ,  $p = 0,33$ ) et J21 ( $H = 0,09$ ,  $p = 0,96$ ). Ainsi, le 9<sup>ème</sup> jour postnatal, les allaitements observés dans les portées ON impliquent moins de jeunes que les allaitements observés dans les portées témoins et contrôles ( $p = 0,002$  dans les deux cas). Enfin, pour les portées exposées à l'obstruction nasale de 9 jours, le nombre maximal de jeunes accédant simultanément aux mamelles est fortement corrélé avec la durée moyenne des événements alimentaires (figure 35B -  $r = 96,2\%$  et  $p = 0,007$ ).

**Bol alimentaire.** La figure 36 montre que la masse spécifique du contenu de l'estomac diffère en fonction du groupe expérimental à J9 ( $F = 16,17$ ,  $p < 0,0001$ ) et J15 ( $F = 6,86$ ,  $p = 0,003$ ), mais pas à J21 ( $F = 0,10$ ,  $p = 0,99$ ). Ainsi, 24h après le traitement, les jeunes exposés à l'obstruction nasale présentent une forte diminution de la masse de nourriture ingérée aussi bien chez les femelles ( $p = 0,0005$  vs témoins;  $p = 0,004$  vs contrôles) que chez les mâles ( $p < 0,0001$  vs témoins;  $p = 0,0002$  vs contrôles). Comparativement aux animaux témoins, le pourcentage de réduction est de 59% chez les femelles et de 64% chez les mâles. Le 15<sup>ème</sup> jour postnatal, c'est-à-dire juste après la réouverture des narines, cette différence tend à s'inverser. En effet, à cet âge, la masse spécifique du contenu stomacal est supérieure chez les mâles exposés à l'obstruction nasale (+ 31% et  $p = 0,03$  vs témoins; + 38% et  $p = 0,003$  vs contrôles) bien qu'aucune différence significative ne soit détectée chez les femelles ( $p = 0,07$  vs témoins;  $p = 0,06$  vs contrôles). Enfin, quel que soit l'âge et le sexe considérés, il n'y a aucune différence significative entre les individus témoins et contrôles ( $0,23 < p < 0,93$ ).



**Figure 35.** (A) Taux maximal d'attachement aux mamelles à 9, 15 et 21 jours chez les animaux témoins (■), contrôles (■) et obstruction nasale (■). (B) Corrélation entre le nombre simultané de jeunes à la mamelle et la durée de l'évènement alimentaire chez les animaux exposés à l'obstruction nasale de 9 jours (test de corrélation de Spearman).  $6 < n < 9$  évènements alimentaires / groupe / sexe / âge. J, jour postnatal. Analyse du Kruskal-Wallis, J9 :  $H = 14,73$  et  $p = 0,0006$ . Analyse du test U de Mann-Withney, <sup>a</sup>  $p < 0,01$  comparé aux portées témoins; <sup>b</sup>  $p < 0,01$  comparé aux portées contrôles.



**Figure 36.** Masse spécifique (mg/g) du bol alimentaire à 9, 15 et 21 jours chez les animaux témoins (■), contrôles (■) et obstruction nasale (■).  $m \pm SEM$ .  $n = 8$  rats / groupe / âge / sexe. J : jour postnatal. Analyse de l'ANOVA à 2 facteurs (effet traitement), J9 :  $F = 16,17$  à 2 degrés de liberté,  $p < 0,0001$ ; J15 :  $F = 6,86$  à 2 degrés de liberté,  $p = 0,003$ . Analyse du PLSD de Fisher, <sup>a</sup>  $p < 0,05$  comparé aux témoins; <sup>b</sup>  $p < 0,05$  comparé aux contrôles.

### 5.2.3.2 Obstruction nasale et croissance

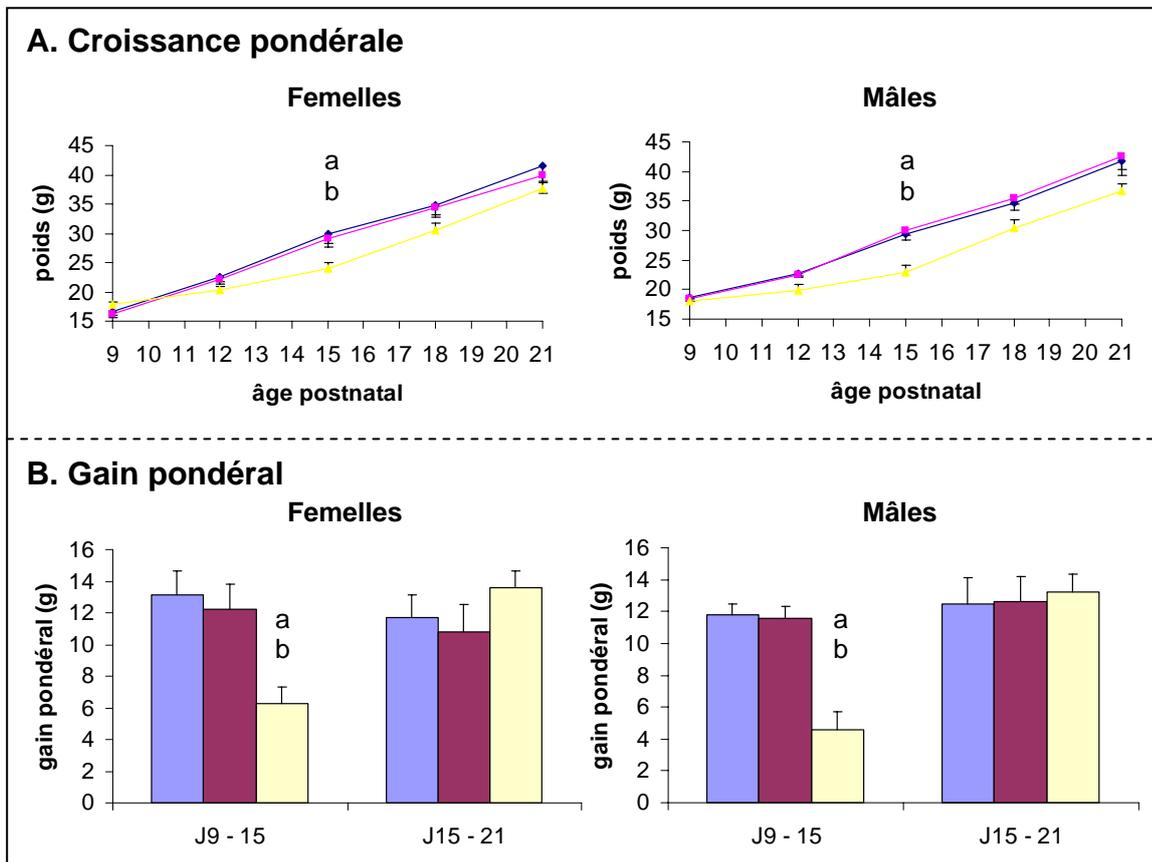
**Croissance pondérale.** La figure 37 montre que la croissance pondérale des individus diffère significativement en fonction du groupe expérimental ( $F = 28,96$ ,  $p < 0,0001$ ). En effet, les animaux exposés à l'obstruction nasale présentent une masse pondérale significativement plus faible à J15 (figure 37A) que ce soit chez les femelles ( $p = 0,0003$  vs témoins;  $p = 0,0014$  vs contrôles) ou chez les mâles ( $p < 0,0001$  vs témoins;  $p = 0,0001$  vs contrôles). Cette disparité est reliée à une différence significative au niveau du gain pondéral sur la période J9 - J15 (figure 37B -  $F = 23,29$ ,  $p < 0,0001$ ). Les individus exposés à l'obstruction nasale présentent ainsi un gain pondéral amoindri par rapport aux animaux témoins ( $p < 0,0001$  chez les femelles;  $p = 0,0001$  chez les mâles) et contrôles ( $p = 0,0004$  chez les femelles;  $p = 0,0002$  chez les mâles). À l'inverse, aucune différence significative n'est observée en ce qui concerne le gain pondéral au cours de la période J15 - J21 ( $F = 0,84$ ,  $p = 0,44$ ).

**Croissance longitudinale.** La croissance en longueur est également affectée par les traitements expérimentaux (figure 38A au verso -  $F = 86,53$ ,  $p < 0,0001$ ). L'obstruction nasale précoce entraîne ainsi une diminution de la longueur des animaux à J15 ( $p < 0,0001$  quel que soit le sexe), différence qui reste significative jusqu'à J21 chez les mâles ( $p < 0,0001$  vs témoins et contrôles). D'autre part, la figure 38B montre que le gain longitudinal des individus diffère significativement en fonction du groupe expérimental entre J9 et J15 ( $F = 10,94$ ;  $p < 0,0001$ ) alors qu'il n'y a aucune différence significative entre J15 et J21 (effet traitement :  $F = 1,07$ ;  $p = 0,35$ ). De J9 à J15, les individus exposés à l'obstruction nasale présentent un gain longitudinal plus faible que les animaux témoins ( $p = 0,02$  chez les femelles et chez les mâles) et contrôles ( $p = 0,005$  chez les femelles;  $p = 0,006$  chez les mâles).

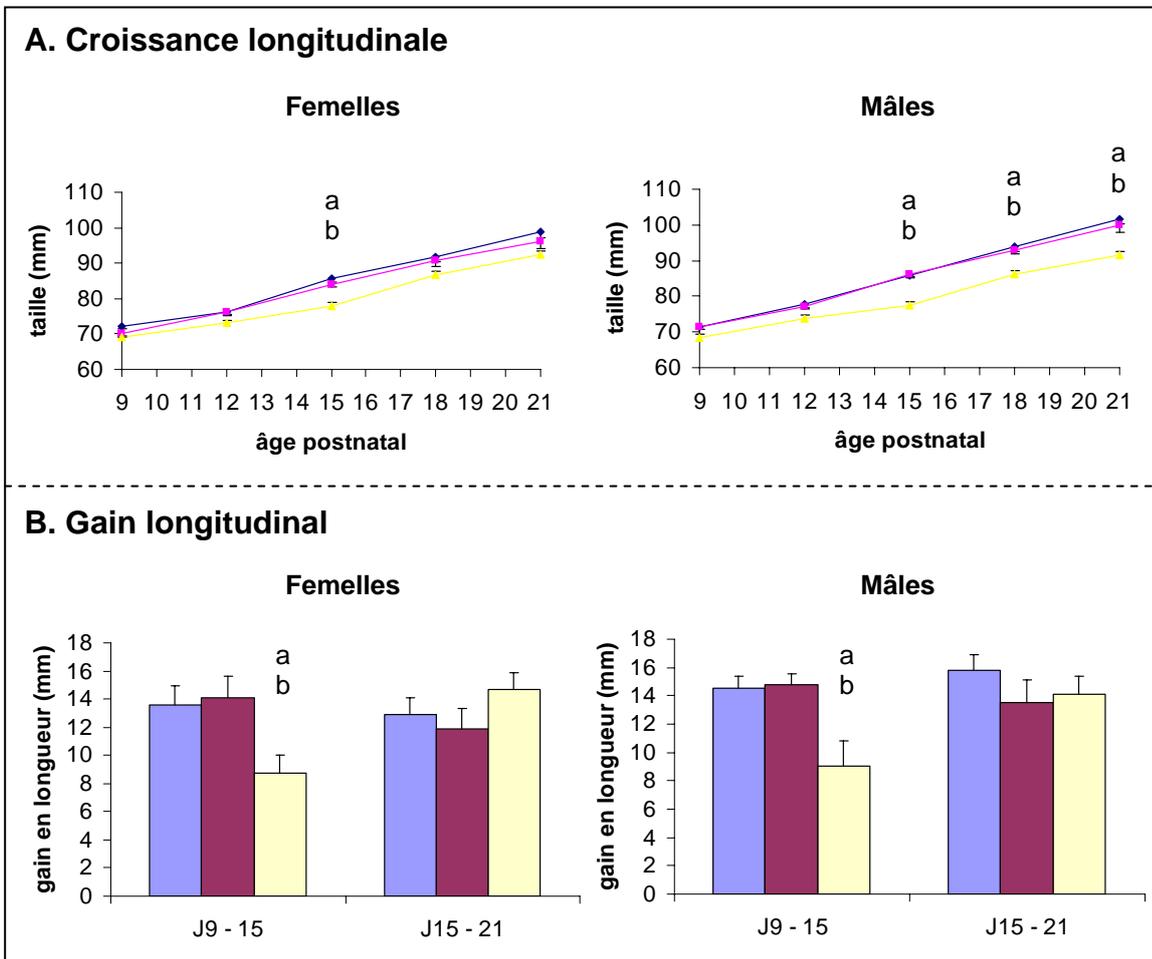
### 5.2.4 Résumé

La prise alimentaire est fortement affectée par l'obstruction nasale. En effet, 24h après le traitement, les portées exposées à l'obstruction nasale présentent une plus grande latence du premier évènement alimentaire, un raccourcissement de la durée moyenne de ces évènements et une diminution du taux d'attachement aux mamelles. Ces modifications se traduisent par une réduction de la quantité de lait ingéré et par un ralentissement de la croissance visible sur la période J9 - J15.

La prise alimentaire est cependant restaurée, voire inversée, à partir du 15<sup>ème</sup> jour postnatal. Les portées exposées à l'obstruction nasale affichent alors une durée totale des évènements alimentaires supérieure aux portées témoins et contrôles. Ceci se traduit



**Figure 37.** Croissance pondérale (A) et gain pondéral (B) des animaux témoins (■), contrôles (■) et obstruction nasale (■) entre le 9<sup>ème</sup> et le 21<sup>ème</sup> jour postnatal.  $m \pm SEM$ .  $n = 20$  rats / groupe / âge / sexe. J : jour postnatal. (A) Analyse de l'ANOVA à 3 facteurs (effet traitement),  $F = 28,96$  à 2 degrés de liberté et  $p < 0,0001$ . (B) Analyse de l'ANOVA à 2 facteurs (effet traitement), J9 - J15 :  $F = 23,29$  à 2 degrés de liberté et  $p < 0,0001$ . Analyse du Bonferroni/Dunn ou du PLSD de Fisher : <sup>a</sup>  $p < 0,01$  par rapport aux témoins; <sup>b</sup>  $p < 0,01$  par rapport aux contrôles.



**Figure 38.** Croissance longitudinale (A) et gain longitudinal (B) des animaux témoins (■), contrôles (■) et obstruction nasale (■) entre le 9<sup>ème</sup> et le 21<sup>ème</sup> jour postnatal.  $m \pm SEM$ .  $n = 20$  rats / groupe / âge / sexe. J : jour postnatal. (A) Analyse de l'ANOVA à 3 facteurs (effet traitement),  $F = 86,53$  à 2 degrés de liberté et  $p < 0,0001$ . (B) Analyse de l'ANOVA à 2 facteurs (effet traitement), J9 - J15 :  $F = 10,94$  à 2 degrés de liberté et  $p < 0,0001$ . Analyse du Bonferroni/Dunn ou du PLSD de Fisher : <sup>a</sup>  $p < 0,001$  par rapport aux témoins; <sup>b</sup>  $p < 0,001$  par rapport aux contrôles.

par une quantité de lait ingéré plus importante chez les mâles ON de 15 jours. La même tendance statistique est observée chez les femelles de 15 jours exposées à l'obstruction nasale. Cet accroissement de la prise alimentaire est associé à une récupération graduelle du retard de croissance. En effet, trois jours après la réouverture des narines, la masse pondérale des individus exposés à l'obstruction nasale est de nouveau comparable à celle des animaux témoins et contrôles.

### **5.3 Obstruction nasale, corticostérone et hormones thyroïdiennes**

#### **5.3.1 Introduction**

Les animaux exposés à l'obstruction nasale présentent un retard de croissance lié au moins en partie à une réduction de la prise alimentaire. Au cours de la période postnatale, une carence alimentaire de quelques heures suffit pour modifier l'équilibre hormonal du jeune. Ainsi, une privation de lait maternel de courte durée (3 à 6 h) induit une diminution significative de la concentration plasmatique en thyroxine chez des rats âgés de 12 et 15 jours (Oberkotter, 1988). D'autre part, une privation alimentaire de 24 h effectuée chez des rats de 20 jours entraîne une augmentation du taux de corticostérone plasmatique (Schmidt *et al.*, 2002). En altérant le conditionnement de l'air inspiré, l'obstruction nasale provoque en outre une hypoxie qui inhibe l'axe thyroïdien et augmente la concentration plasmatique en corticostérone chez les individus juvéniles (Raff *et al.*, 2003; Zayour *et al.*, 2003).

L'obstruction nasale bilatérale peut donc être considérée comme une situation stressante multifactorielle : en plus de l'appauvrissement global de l'environnement olfactif, d'autres facteurs tels que la privation alimentaire et l'hypoxie pourraient activer la réponse neuroendocrine au stress. Toutefois, du 2<sup>ème</sup> au 14<sup>ème</sup> jour postnatal, le rat présente une inhibition de la réponse adrénalinienne au stress (Sapolsky et Meaney, 1986). Ainsi, bien que l'exposition à différents facteurs de stress entraîne une hausse significative de la concentration plasmatique en ACTH durant les deux premières semaines de vie, la sécrétion de corticostérone est inhibée pendant cette même période (Walker *et al.*, 2004).

Comme la corticostérone, les hormones thyroïdiennes conduisent à une augmentation globale du métabolisme oxydatif, favorisant ainsi la thermogénèse et l'utilisation des réserves énergétiques (Silva, 2003). Les glucocorticoïdes et les hormones thyroïdiennes influencent par ailleurs la croissance musculaire de l'individu. L'augmentation des niveaux plasmatiques en corticostérone et l'hypothyroïdisme entraînent ainsi une atrophie des muscles squelettiques et notamment des muscles oro-faciaux (Hartmann *et al.*, 1999; Ganji

et Behzadi, 2007). L'excès de glucocorticoïdes et l'hypothyroïdisme postnatal possèdent également des effets délétères sur la synaptogénèse (Koibuchi et Chin, 2000) et sur la prolifération neuronale au sein des éléments constitutifs du système olfactif (Hoyk *et al.*, 1996; Van Den Hove *et al.*, 2006). Ce défaut de maturation du système nerveux central peut avoir des conséquences à long-terme sur les capacités d'apprentissage et de mémorisation (Rivas et Naranjo, 2007). La corticostérone et les hormones thyroïdiennes pourraient donc expliquer une partie des incidences comportementales et physiologiques de l'obstruction nasale bilatérale. Nous nous sommes donc intéressés à l'impact de l'obstruction nasale sur le système neuroendocrinien en nous focalisant sur la réponse adrénalinienne au stress et sur les hormones thyroïdiennes :

- *L'obstruction nasale se traduit-elle par la mise en place d'une réponse adrénalinienne au stress ?*
- *L'obstruction nasale bilatérale influence-t-elle les concentrations en hormones thyroïdiennes ?*

### 5.3.2 Matériel et méthodes expérimentales

#### 5.3.2.1 *Glandes surrénales*

Après dissection, les glandes surrénales sont pesées, fixées (cf. modèle expérimental et méthodes générales, p.36) puis colorées par la méthode hématoxyline - éosine. Dans un premier temps, les noyaux sont colorés en bleu - violet avec une solution d'hématoxyline. La deuxième phase est la contre-coloration à l'éosine qui fait apparaître le cytoplasme, le collagène, la kératine et les érythrocytes en rouge. Les glandes surrénales des individus témoins, contrôles et obstruction nasale sont colorées selon le protocole suivant :

- Déparaffinage à l'Histolemon (Carlo Erba Réactifs, France) pendant 1h
- Réhydratation dans des bains d'alcool de concentrations décroissantes : trois bains d'alcool à 100° (5 min par bain), deux bains d'alcool à 95° (5 min par bain), deux bains d'alcool à 70° (5 min par bain) puis trois bains d'eau distillée (2 min par bain).
- Coloration à l'Hématoxyline de Mayer (Carl Roth, Allemagne) pendant 10 min
- Rinçage à l'eau courante pendant 1 min
- Lavage par une solution alcoolique d'HCl (0,1% dans l'alcool à 95°) pendant 5 min
- Différenciation, c'est-à-dire bleuissement des noyaux, à l'eau courante pendant 5 min
- Coloration à l'éosine Y (Carl Roth, Allemagne) pendant 10 min
- Rinçage à l'eau courante pendant 1 min

- Déshydratation dans des bains d'alcool de concentrations croissantes (70, 95 puis 100°, 1min par bain)
- Montage (Clearium Mountant, Surgipath europe LTD)

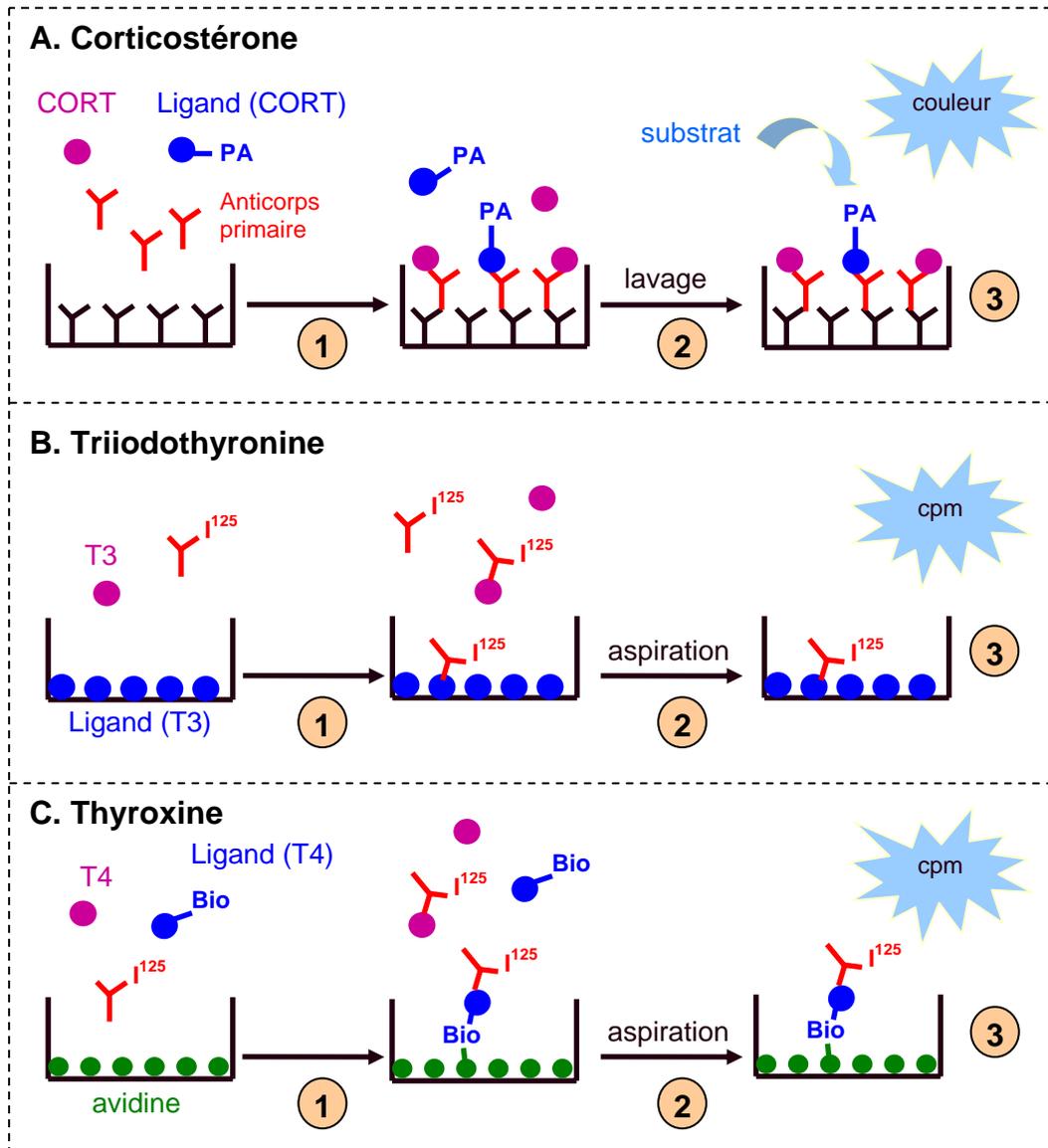
Ces coupes sont finalement observées au microscope optique (grossissement : 10 x 6,3). La taille des zones corticale et médullaire des glandes surrénales est mesurée en longueur et en largeur à l'aide d'un micromètre oculaire. Toutes les mesures sont effectuées au centre de l'organe à raison de deux coupes par lames (3 à 5 lames par individus).

### 5.3.2.2 Dosage hormonaux

**Corticostérone.** La concentration plasmatique en corticostérone est mesurée en utilisant un kit EIA, selon les instructions du fabricant (Assay designs Inc., USA). Le dosage enzymo-immunologique de la corticostérone est un dosage par compétition (figure 39A). Les échantillons à doser sont incubés (2h à 37°C) en présence de corticostérone marquée à la phosphatase alcaline. Une compétition s'établit alors entre la corticostérone de l'échantillon et la corticostérone marquée. Suite à l'incubation, les réactifs en excès sont éliminés et le substrat de la phosphatase alcaline est ajouté. Après 1h d'incubation à 37°C, la réaction enzymatique est stoppée et la densité optique à 405 nm est mesurée par un lecteur de micro-plaques (BioRad, M450). L'intensité de la coloration est inversement proportionnelle à la concentration en corticostérone des échantillons. La concentration est finalement déterminée graphiquement à partir de la courbe étalon et de la densité optique mesurée. Les coefficients de variation intra- et inter-essais sont respectivement inférieurs à 8,4 et 13,1%.

**Hormones thyroïdiennes.** Les concentrations plasmatiques en T3 et T4 sont mesurées en utilisant des kits RIA, selon les instructions du fabricant (Immunotech SA, France). Le dosage radioimmunologique de la T3 est un dosage par compétition utilisant le principe de l'anticorps marqué à l'iode 125 (figure 39B). Les échantillons à doser sont incubés dans des tubes recouverts d'un analogue de la T3 (ligand), avec un anticorps spécifique de la T3 marqué à l'iode 125. Une compétition s'établit entre la T3 libre de l'échantillon et le ligand pour la liaison à l'anticorps marqué. Après incubation, le contenu du tube est vidé par aspiration, puis la radioactivité liée est mesurée. La concentration en T3 est finalement déterminée à partir de la courbe étalon pré-établie. Les coefficients de variation intra- et inter-essais sont respectivement inférieurs à 6,4 et 5,5%.

Le dosage radioimmunologique de la T4 obéit à un principe similaire (figure 39C). Les échantillons à doser sont incubés dans des tubes recouverts d'avidine, en présence d'un anticorps spécifique de la T4 marqué à l'iode 125 et d'un analogue biotinylé de la T4 (ligand).



**Figure 39.** Principe des dosages immunologiques par compétition : dosage enzymo-immunologique de la corticostérone (A) et dosages radio-immunologiques de la triiodothyronine (B) et de la thyroxine (C). CORT : corticostérone, T3 : triiodothyronine, T4 : thyroxine, PA : phosphatase alcaline, cpm : coups par minute, Bio : biotine.

1. Incubation du plasma contenant l'antigène (corticostérone, T3 ou T4 des échantillons) avec des anticorps monoclonaux spécifiques de l'antigène et avec le ligand (compétiteur).
2. Lavages ou aspiration pour éliminer les réactifs en excès.
3. Incubation en présence du substrat puis mesure de la densité optique à 405 nm pour la corticostérone ou mesure de la radioactivité liée pour les hormones thyroïdiennes. La densité optique et la radioactivité mesurées sont inversement proportionnelles à la quantité d'hormones dans l'échantillon.

Une compétition s'établit entre la T4 libre de l'échantillon et le ligand pour la liaison à l'anticorps marqué. La fraction d'anticorps complexé au ligand biotinylé se fixe sur les tubes avidinés. Après incubation, le contenu du tube est vidé par aspiration, puis la radioactivité liée est mesurée. La concentration en T4 est finalement déterminée à partir de la courbe étalon pré-établie. Les coefficients de variation intra- et inter-essais sont respectivement inférieurs à 6,7 et 6,5%.

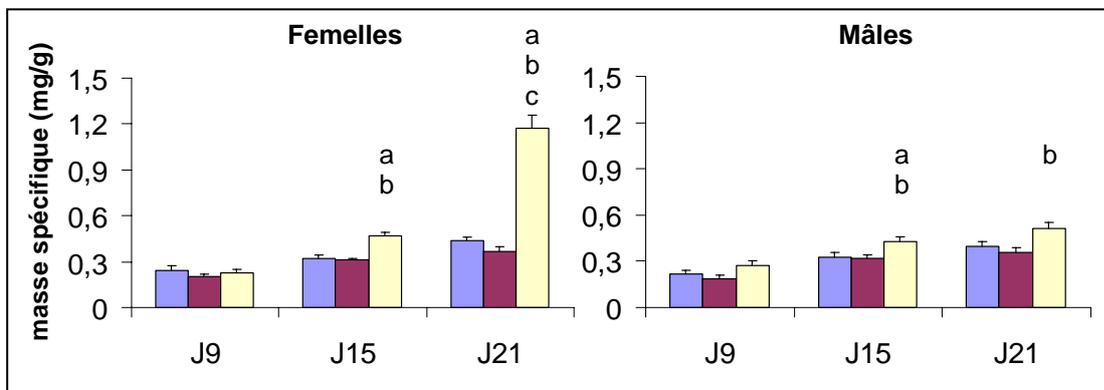
### 5.3.2.3 Analyses statistiques

Toutes les variables sont analysées par une ANOVA à deux facteurs (sexe \* traitement) suivie du test PLSD de Fischer pour comparer les moyennes spécifiques de chaque groupe expérimental.

### 5.3.3 Résultats

#### 5.3.3.1 Glandes surrénales et corticostérone

**Masse spécifique des glandes surrénales.** La figure 40 montre que l'obstruction nasale est associée à des modifications de la masse spécifique des glandes surrénales à J15 ( $F = 9,79$ ;  $p < 0,0001$ ) et J21 ( $F = 29,13$ ;  $p < 0,0001$ ). On observe en outre un effet additionnel du sexe des individus sur la masse des glandes surrénales à 21 jours (effet sexe \* traitement :  $F = 20,99$  et  $p < 0,0001$ ). Ainsi, 24h après le traitement, la masse des glandes surrénales n'est pas modifiée par l'obstruction nasale ( $F = 2,27$ ;  $p = 0,06$ ). À J15, on constate une hypertrophie des glandes surrénales touchant aussi bien les femelles ( $p < 0,0001$  vs témoins et contrôles) que les mâles ( $p = 0,002$  vs témoins;  $p = 0,0008$  vs contrôles). Comparativement aux animaux contrôles de 15 jours, les glandes surrénales des individus exposés à l'obstruction nasale affichent une hypertrophie de 52% chez les femelles et de 34% chez les mâles. À J21, les glandes surrénales restent hypertrophiées chez les femelles ON non seulement par rapport aux femelles témoins et contrôles, mais également vis-à-vis de leurs homologues mâles (+ 216 % par rapport aux femelles contrôles;  $p < 0,0001$  dans tous les cas). Chez les mâles de 21 jours, les individus exposés à l'obstruction nasale présentent une masse des glandes surrénales significativement supérieure à celle des individus contrôles ( $p = 0,04$ ), bien que la différence vis-à-vis des témoins ne soit plus significative ( $p = 0,39$ ). Enfin, les glandes surrénales témoins et contrôles ont une masse spécifique comparable indépendamment de l'âge ou du sexe des individus ( $0,186 < p < 0,89$ ).



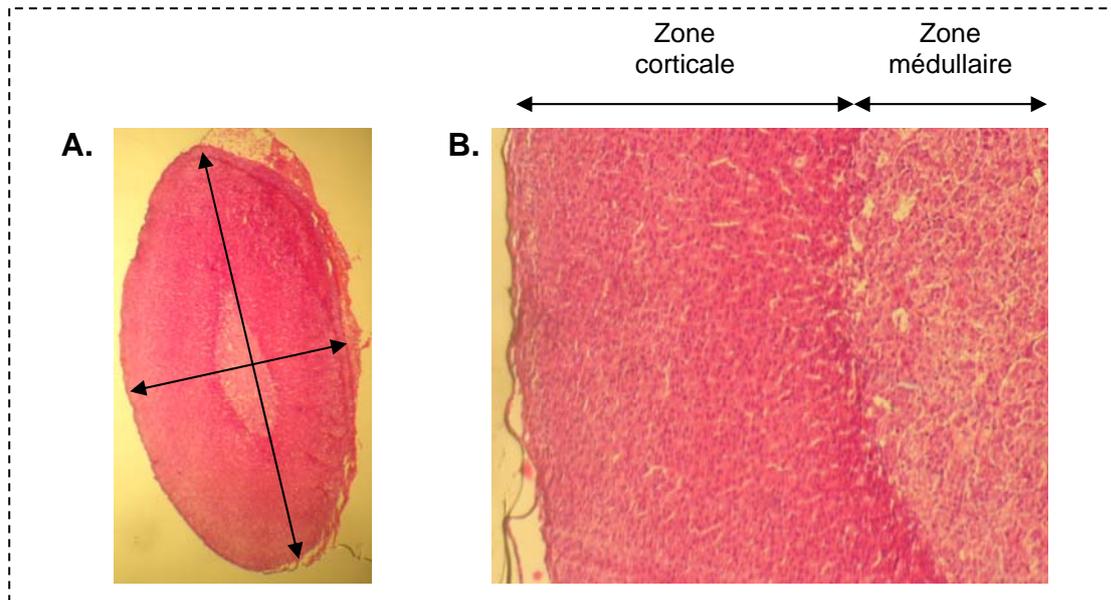
**Figure 40.** Masse spécifique des glandes surrénales à 9, 15 et 21 jours chez les animaux témoins (■), contrôles (■) et obstruction nasale (■).  $m \pm \text{SEM}$ .  $n = 8$  rats / groupe / âge / sexe. J : jour postnatal. Analyse de l'ANOVA à 2 facteurs (effet traitement), J15 :  $F = 9,79$  à 2 degrés de liberté,  $p < 0,0001$ ; J21 :  $F = 29,13$  à 2 degrés de liberté,  $p < 0,0001$ . Analyse du PLSD de Fisher, <sup>a</sup>  $p < 0,05$  comparé aux témoins; <sup>b</sup>  $p < 0,05$  comparé aux contrôles; <sup>c</sup>  $p < 0,05$  comparé aux homologues mâles.

**Histologie des glandes surrénales.** Un exemple de coloration de glandes surrénales par la méthode hématoxyline-éosine est présenté dans la figure 41. Les résultats de l'analyse sont résumés dans le tableau 12. Celui-ci montre qu'au centre de l'organe, les corticosurrénales occupent entre 60 et 68 % du total de la glande. Que ce soit chez les femelles ou chez les mâles, les individus témoins présentent la taille relative des corticosurrénales la plus faible, suivis des animaux contrôles puis des rats exposés à l'obstruction nasale (+ 9% par rapport aux témoins).

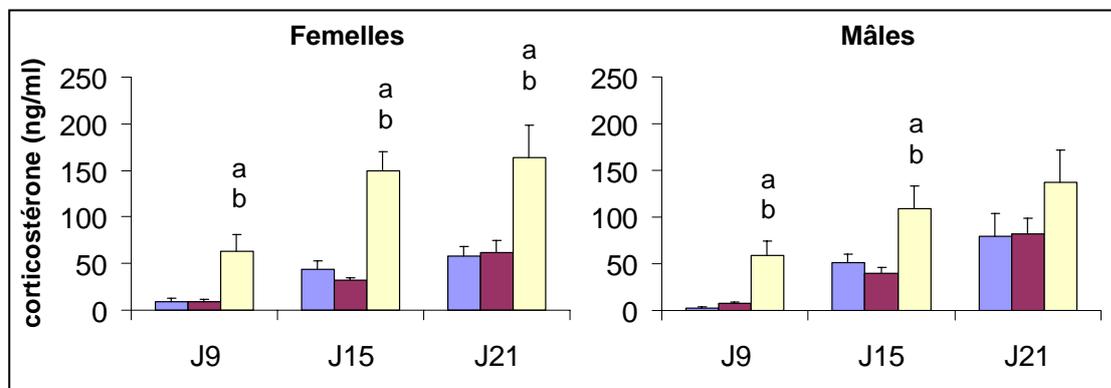
<b>Taille relative des corticosurrénales (%)</b>		
	<i>Femelles</i>	<i>Mâles</i>
<b>Témoins</b>	62,3 ± 1,0	59,9 ± 1,9
<b>Contrôles</b>	63,9 ± 2,2	63,2 ± 0,4
<b>Obstruction nasale</b>	67,7 ± 1,4	65,3 ± 1,2

**Tableau 12.** Taille relative des corticosurrénales (%) chez les animaux témoins, contrôles et obstruction nasale de 21 jours.  $m \pm SEM$ .  $n = 3$  glandes surrénales par groupe et par sexe. Aucun test statistique n'a pu être réalisé du fait des effectifs trop faibles.

**Taux de corticostérone.** Concernant la concentration plasmatique en corticostérone, une différence significative entre les groupes expérimentaux est détectée à J9 ( $F = 21,40$ ;  $p < 0,0001$ ), J15 ( $F = 23,60$ ;  $p < 0,0001$ ) et J21 ( $F = 2,86$ ;  $p = 0,03$ ). La figure 42 montre que quel que soit leur âge, les individus témoins et contrôles présentent une concentration en corticostérone comparable aussi bien chez les femelles que chez les mâles ( $0,62 < p < 0,99$ ). Les animaux exposés à l'obstruction nasale affichent au contraire une augmentation significative du taux de corticostérone plasmatique. Chez les femelles, cette élévation est observée 24h après le traitement (J9 :  $p = 0,0003$  vs témoins et contrôles), à la fin de la période d'obstruction nasale (J15 :  $p < 0,0001$  vs témoins et contrôles) et se maintient jusqu'au 21<sup>ème</sup> jour postnatal ( $p = 0,007$  vs témoins;  $p = 0,006$  vs contrôles). Chez les mâles, l'augmentation est significative à J9 ( $p = 0,0001$  vs témoins;  $p = 0,0004$  vs contrôles) et J15 ( $p = 0,009$  vs témoins;  $p = 0,003$  vs contrôles) mais pas à J21 ( $p = 0,14$  vs témoins;  $p = 0,13$  vs contrôles).



**Figure 41.** Exemple de coloration des glandes surrénales par la méthode hématoxyline - éosine chez une femelle contrôle de 21 jours. (A) mesures effectuées à partir du micromètre oculaire (grossissement 10 x 2,5). (B) zones corticale et médullaire des glandes surrénales (grossissement 10 x 6,3).



**Figure 42.** Concentration plasmatique en corticostérone (ng/ml) à 9, 15 et 21 jours chez les animaux témoins (■), contrôles (■) et obstruction nasale (■).  $m \pm SEM$ .  $n = 8$  rats / groupe / âge / sexe. J : jour postnatal. Analyse de l'ANOVA à 2 facteurs (effet traitement), J9 :  $F = 21,40$  à 2 degrés de liberté,  $p < 0,0001$ ; J15 :  $F = 23,60$  à 2 degrés de liberté,  $p < 0,0001$ ; J21 :  $F = 2,86$  à 2 degrés de liberté,  $p = 0,026$ . Analyse du PLSD de Fischer : <sup>a</sup>  $p < 0,05$  comparé aux témoins; <sup>b</sup>  $p < 0,05$  comparé aux contrôles.

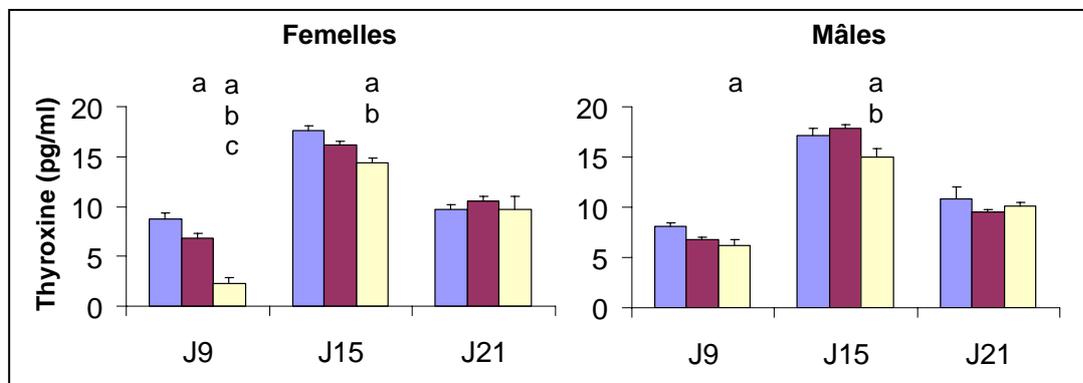
### 5.3.3.2 Hormones thyroïdiennes

**Thyroxine (T4).** La figure 43 montre que la concentration plasmatique en T4 diffère selon les groupes expérimentaux à J9 ( $F = 36,36$ ;  $p < 0,0001$ ) et J15 ( $F = 13,94$ ;  $p < 0,0001$ ). Vingt-quatre heures après le traitement, les femelles contrôles présentent ainsi une diminution significative du taux de T4 par rapport aux femelles témoins ( $p = 0,01$ ). La même tendance statistique est observée chez les mâles contrôles bien que la différence vis-à-vis des témoins ne soit pas significative ( $p = 0,06$ ). D'autre part, les femelles exposées à l'obstruction nasale présentent une forte diminution de la concentration en T4 non seulement par rapport aux femelles témoins et contrôles, mais également par rapport à leurs homologues mâles ( $p < 0,0001$  dans tous les cas). Le 15<sup>ème</sup> jour postnatal, il n'y a plus de différence significative entre les animaux témoins et contrôles ( $p = 0,08$  chez les femelles;  $p = 0,34$  chez les mâles). En revanche, les individus exposés à l'obstruction nasale affichent une baisse significative de la concentration en T4 aussi bien chez les femelles ( $p = 0,0002$  vs témoins;  $p = 0,03$  vs contrôles) que chez les mâles ( $p = 0,008$  vs témoins;  $p = 0,0005$  vs contrôles). À 21 jours, aucune différence significative n'est détectée entre les différents lots expérimentaux ( $F = 0,78$ ;  $p = 0,57$ ).

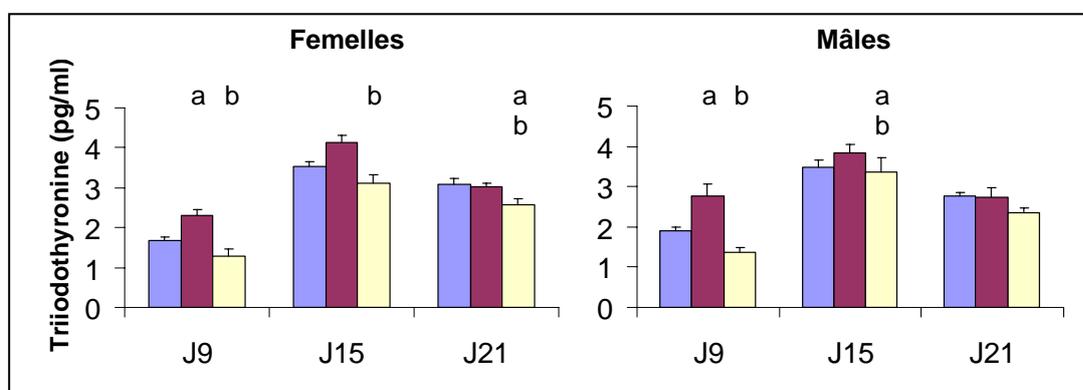
**Triiodothyronine (T3).** La figure 44 montre que la concentration plasmatique en T3 diffère selon les groupes expérimentaux à J9 ( $F = 24,26$ ;  $p < 0,0001$ ), J15 ( $F = 5,62$ ;  $p = 0,007$ ) et J21 ( $F = 7,25$ ;  $p < 0,0001$ ). À l'inverse de ce qui est observé pour la T4, la concentration en T3 est supérieure à 9 jours chez les individus contrôles comparés aux témoins ( $p = 0,007$  chez les femelles;  $p = 0,001$  chez les mâles). À cet âge, les animaux exposés à l'obstruction nasale présentent un taux de T3 plasmatique inférieur aux contrôles ( $p = 0,0003$  chez les femelles;  $p < 0,0001$  chez les mâles) mais comparable aux témoins ( $p = 0,26$  chez les femelles;  $p = 0,06$  chez les mâles). Le 15<sup>ème</sup> jour postnatal, la concentration en T3 reste inférieure chez les femelles exposées à l'obstruction nasale vis-à-vis des femelles contrôles uniquement ( $p = 0,19$  vs témoins;  $p = 0,003$  vs contrôles). Il n'y a plus aucune différence significative entre les mâles ( $0,14 < p < 0,69$ ). À 21 jours, la concentration en T3 est inférieure chez les animaux exposés à l'obstruction nasale que ce soit chez les femelles ( $p = 0,0009$  vs témoins;  $p = 0,004$  vs contrôles) ou chez les mâles ( $p = 0,03$  vs témoins;  $p < 0,0001$  vs contrôles).

### 5.3.4 Résumé

Notre étude montre une augmentation de la concentration plasmatique en corticostérone 24h après le traitement (J9) et à la fin de la période d'obstruction nasale (J15). Chez les femelles exposées à l'obstruction nasale, la concentration en corticostérone reste significativement supérieure jusqu'au 21<sup>ème</sup> jour postnatal, soit 6 jours après la



**Figure 43.** Concentration plasmatique en thyroxine (pg/ml) à 9, 15 et 21 jours chez les animaux témoins (■), contrôles (■) et obstruction nasale (■).  $m \pm SEM$ .  $n = 8$  rats / groupe / âge / sexe. J : jour postnatal. Analyse de l'ANOVA à 2 facteurs (effet traitement), J9 :  $F = 36,36$  à 2 degrés de liberté,  $p < 0,0001$ ; J15 :  $F = 13,94$  à 2 degrés de liberté,  $p < 0,0001$ . Analyse du PLSD de Fischer : <sup>a</sup>  $p < 0,05$  comparé aux témoins; <sup>b</sup>  $p < 0,05$  comparé aux contrôles; <sup>c</sup>  $p < 0,05$  comparé aux homologues mâles.



**Figure 44.** Concentration plasmatique en triiodothyronine (pg/ml) à 9, 15 et 21 jours chez les animaux témoins (■), contrôles (■) et obstruction nasale (■).  $m \pm SEM$ .  $n = 8$  rats / groupe / âge / sexe. J : jour postnatal. Analyse de l'ANOVA à 2 facteurs (effet traitement), J9 :  $F = 24,26$  à 2 degrés de liberté,  $p < 0,0001$ ; J15 :  $F = 5,62$  à 2 degrés de liberté,  $p = 0,007$ ; J21 :  $F = 7,25$  à 2 degrés de liberté,  $p < 0,0001$ . Analyse du PLSD de Fischer : <sup>a</sup>  $p < 0,05$  comparé aux témoins; <sup>b</sup>  $p < 0,05$  comparé aux contrôles.

réouverture des narines. En revanche, il n'y a plus aucune différence significative entre les mâles de 21 jours.

De plus, l'hypertrophie des glandes surrénales, qui est en rapport direct avec l'exposition chronique au stress, est plus marquée chez les femelles; lesquelles présentent une masse spécifique des glandes surrénales supérieures à leurs homologues mâles de 21 jours.

Par ailleurs, 24h après le traitement, les individus contrôles affichent une augmentation de la concentration en T3 et une diminution de la concentration en T4. Ces effets sont cependant limités dans le temps puisque aucune différence significative n'est détectée entre les animaux témoins et contrôles de 15 et 21 jours. Chez les individus exposés à l'obstruction nasale, on constate une diminution des concentrations en hormones thyroïdiennes touchant aussi bien la T4 que la T3. En effet, l'obstruction nasale est associée à une diminution des concentrations en T4 à J9 et J15, alors que l'on observe une diminution de la concentration en T3 à J21. Vingt-quatre heures après le traitement, la baisse de la concentration en T4 est significativement plus importante chez les femelles ON comparées à leurs homologues mâles.

## **5.4 Obstruction nasale, organes lymphoïdes et réponse proliférative**

*Le travail expérimental présenté dans cette partie a donné lieu à la rédaction d'un article publié dans la revue "Psychoneuroendocrinology" [2006 Sep; 31(8): 997-1008] et intitulé "Effect of early olfactory deprivation on novelty seeking behavior and primary and secondary lymphoid organs in young rats". Cet article est présenté en annexe 2.*

### **5.4.1 Introduction**

L'obstruction nasale précoce est associée à la mise en place d'une réponse adrénaliennne au stress et à une réduction des niveaux plasmatiques en hormones thyroïdiennes. L'hypercortico-stéronémie est connue pour avoir des effets délétères sur les organes lymphoïdes et des impacts immuno-modulateurs sur la réponse immunitaire spécifique (cf. introduction générale, p.28). Les glucocorticoïdes entraînent notamment une augmentation de l'apoptose des thymocytes, une réduction de leur prolifération et une diminution de la masse thymique (Tarcic *et al.*, 1998; Groer *et al.*, 2002). Les hormones thyroïdiennes ont quant-à-elles un impact stimulant sur le système immunitaire (Fabris *et al.*, 1995). L'injection de T3/T4 provoque ainsi un accroissement de la masse thymique et une augmentation du nombre de thymocytes sans doute liée à une stimulation de leur

prolifération (Johnson *et al.*, 1992; Villa-Verde *et al.*, 1993). A l'inverse, la thyroïdectomie et l'hypothyroïdisme se traduisent par une atrophie du thymus et par une diminution du nombre de lymphocytes circulants (Fabris, 1981).

D'autre part, l'obstruction nasale bilatérale se traduit par une diminution des capacités olfactives et la littérature rapporte une involution du thymus, une atrophie de la rate, une baisse de la réponse proliférative des lymphocytes sanguins et une perturbation de la réponse immunitaire spécifique suite à l'induction d'une bulbectomie olfactive bilatérale (Song et Leonard, 1994; Connor *et al.*, 2000). Cette procédure permanente possède néanmoins de nombreux impacts systémiques qu'il est souvent difficile de dissocier des effets de la privation olfactive proprement dite (Song et Leonard, 2005).

La privation nutritionnelle entraîne également une atrophie du thymus (Chandra, 1991), organe habituellement désigné comme le "baromètre de la malnutrition" (Jackson, 1925). Cette atrophie est, là encore, liée à une baisse importante du nombre de thymocytes (Howard *et al.*, 1999). Les cellules circulantes peuvent également être touchées par la sous-nutrition. Chez le chat, sept jours de diète entraînent en effet une baisse du nombre de leucocytes et de lymphocytes circulants (Freitag *et al.*, 2000). Ces effets ne sont pas complètement supprimés après sept jours de réalimentation. Chez les rongeurs adultes, la privation nutritionnelle entraîne une atrophie de la rate, une réduction du nombre de splénocytes et une diminution de leur réponse proliférative (Howard *et al.*, 1999; Cunha *et al.*, 2003).

Comme l'augmentation du taux de glucocorticoïdes plasmatiques et l'hypothyroïdisme, les privations olfactive et alimentaire pourraient donc entraîner d'importants effets délétères sur les organes lymphoïdes et sur la fonction lymphoproliférative. Pourtant, les conséquences de l'obstruction nasale précoce sur le développement du système immunitaire n'ont, à notre connaissance, jamais été examinées. Pour ces différentes raisons, le travail expérimental exposé dans cette partie vise à répondre aux questions suivantes :

- *L'obstruction nasale affecte-t-elle la masse relative du thymus et de la rate ?*
- *L'obstruction nasale perturbe-t-elle la réponse proliférative des thymocytes et des splénocytes ?*

## 5.4.2 Matériel et méthodes expérimentales

### 5.4.2.1 *Etude histologique du thymus*

Après dissection, les thymus sont pesés, fixés (cf. modèle expérimental et méthodes générales, p.36) puis colorés par la méthode de Mann-Dominici. Cette méthode utilise de l'éosine Y, de l'orange G et du bleu de toluidine. Elle a été préconisée par ses inventeurs pour l'étude des tissus hématopoïétiques (Gabe, 1968). Elle offre en effet un excellent contraste entre les zones thymiques corticales et médullaires. Les thymus des individus témoins, contrôles et obstruction nasale sont colorés selon le protocole suivant :

- Déparaffinage à l'Histolemon (Carlo Erba Réactifs, France) pendant 1h
- Réhydratation dans des bains d'alcool de concentrations décroissantes : trois bains d'alcool à 100° (5 min par bain), deux bains d'alcool à 95° (5 min par bain), deux bains d'alcool à 70° (5 min par bain) puis trois bains d'eau distillée (2 min par bain).
- Coloration à l'éosine - orange (0,2% d'éosine Y et 0,6% d'orange G en solution aqueuse) pendant 3 min
- Rinçage à l'eau courante pendant 1 min
- Coloration au bleu de toluidine (0,5% en solution aqueuse) pendant 3 min
- Rinçage à l'eau courante pendant 1 min
- Différenciation à l'eau acétifiée (0,2%) pendant 3 min
- Rinçage à l'eau courante pendant 1 min
- Déshydratation dans des bains d'alcool de concentrations croissantes (95 puis 100°, 1min par bain)
- Montage (Clearium Mountant, Surgipath europe LTD)

Ces coupes sont finalement photographiées, puis la surface relative des zones médullaires est calculée à l'aide d'un logiciel d'analyse d'images (ImageJ 1.38x, Wayne Rasband, National Institute of Health, USA, disponible sur <http://rsb.info.nih.gov/ij/>). Afin d'augmenter la précision des mesures, trois coupes par lames (3 à 5 lames par individus) sont utilisées pour l'analyse.

### 5.4.2.2 *Tests de prolifération cellulaire*

La réponse proliférative aux mitogènes des thymocytes et des splénocytes est analysée par un test MTS (CellTiter 96<sup>®</sup> Aqueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay Kit, Promega Corporation, USA). Ces tests sont effectués sur des thymocytes et des splénocytes issus des organes lymphoïdes prélevés en conditions stériles. Ces tests de prolifération cellulaire nécessitent que le système immunitaire ait atteint un certain degré de

maturité et sont donc entrepris exclusivement à 21 jours. Pour ce faire, le thymus et la rate sont désagrégés dans du milieu de culture RPMI enrichi avec 25 mM de Hepes, 2 mM de L-glutamine et 10 % de sérum de veau fœtal. Le nombre de thymocytes / splénocytes est ensuite déterminé à l'aide d'un hémocytomètre puis la suspension cellulaire est ajustée à une concentration de  $4 \times 10^6$  cellules/ml.

Les mitogènes Concanavaline A (ConA) et Phytohémataglutinine (PHA) sont alors utilisés pour évaluer la réponse proliférative des thymocytes et des splénocytes. 50  $\mu$ l de suspension cellulaire, soit  $2 \times 10^5$  cellules, sont ajoutés en triplicat dans les puits d'une plaque de micro-titration à fond plat de 96 puits contenant 50  $\mu$ l de milieu ou de mitogène (ConA ou PHA dont les concentrations finales respectives sont de 2,5  $\mu$ g/ml et 4%). Les plaques sont ensuite incubées à 37°C dans une atmosphère humide contenant 5% de CO<sub>2</sub>. Après 48h d'incubation, 20  $\mu$ l de MTS sont ajoutés dans chaque puits de façon à déterminer le nombre de cellules viables. Les plaques sont incubées 4h à 37°C (atmosphère humide, 5% de CO<sub>2</sub>) puis la quantité de formazan produite par la réduction cellulaire du MTS est déterminée en mesurant l'absorbance à 490 nm grâce à un lecteur de microplaque (BioRad, M450).

Les résultats sont présentés sous forme d'indices de prolifération (IP) :

$$IP = \frac{DO_{nette} \text{ avec mitogène}}{DO_{nette} \text{ sans mitogène}}$$

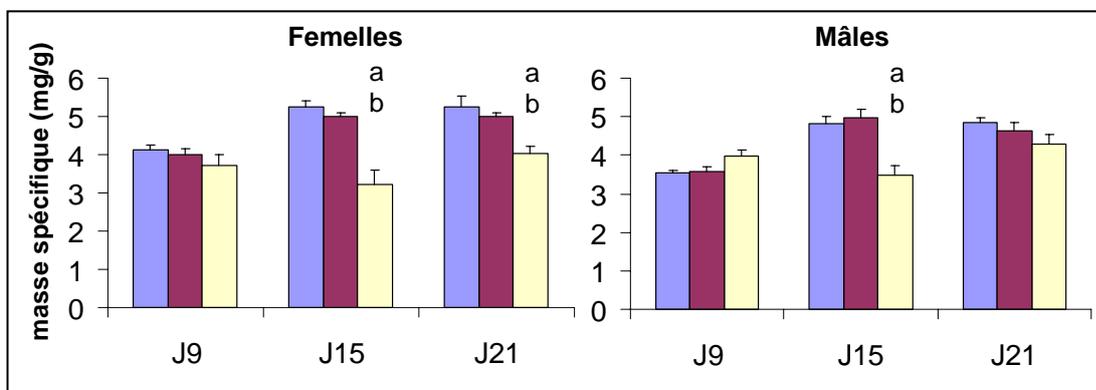
#### 5.4.2.3 Analyses statistiques

Toutes les variables sont analysées par une ANOVA à deux facteurs (sexe \* traitement) suivie du test PLSD de Fischer pour comparer les moyennes spécifiques de chaque groupe expérimental.

### 5.4.3 Résultats

#### 5.4.3.1 Impacts sur le thymus

**Masse spécifique.** La figure 45 montre que la masse thymique est affectée par l'obstruction nasale à partir du 15<sup>ème</sup> jour postnatal (J9 :  $F = 2,11$ ;  $p = 0,08$  et J15 :  $F = 13,88$ ;  $p < 0,0001$ ). Cet impact est également détecté à J21, soit six jours après la réouverture des narines ( $F = 4,64$ ;  $p = 0,002$ ). Le thymus des individus témoins et contrôles présente une masse spécifique comparable quels que soient l'âge ou le sexe des individus ( $0,38 < p < 0,59$ ). À partir du 15<sup>ème</sup> jour postnatal, les animaux exposés à l'obstruction nasale affichent au contraire une diminution de la masse thymique aussi bien chez les femelles ( $p < 0,0001$  vs témoins et contrôles) que chez les mâles ( $p = 0,002$  vs



**Figure 45.** Masse spécifique du thymus à 9, 15 et 21 jours chez les animaux témoins (■), contrôles (■) et obstruction nasale (■).  $m \pm \text{SEM}$ .  $n = 8$  rats / groupe / âge / sexe. J : jour postnatal. Analyse de l'ANOVA à 2 facteurs (effet traitement), J15 :  $F = 13,88$  à 2 degrés de liberté,  $p < 0,0001$ ; J21 :  $F = 4,64$  à 2 degrés de liberté,  $p = 0,002$ . Analyse du PLSD de Fisher, <sup>a</sup>  $p < 0,01$  comparé aux témoins; <sup>b</sup>  $p < 0,01$  comparé aux contrôles.

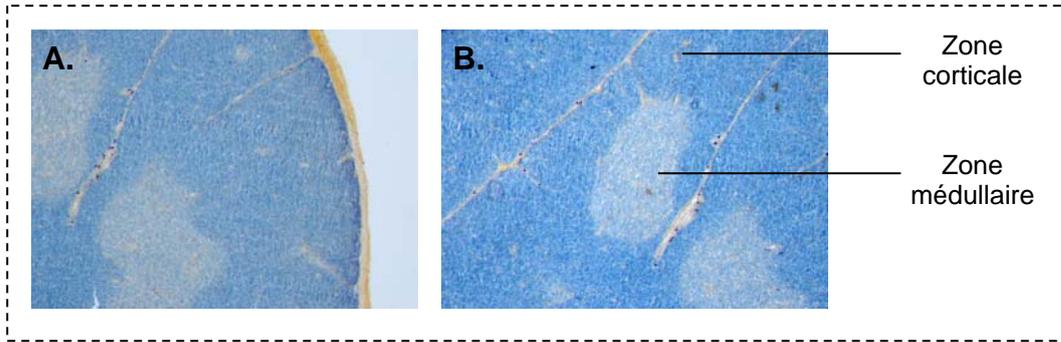
témoins;  $p = 0,0006$  vs contrôles). Comparativement aux contrôles, le pourcentage de réduction est de 35 % chez les femelles et de 30 % chez les mâles. Cette atrophie spécifique subsiste jusqu'au 21<sup>ème</sup> jour chez les femelles ( $p = 0,0002$  vs témoins;  $p = 0,001$  vs contrôles). À cet âge, il n'existe plus aucune différence significative entre les mâles des différents lots expérimentaux ( $p = 0,08$  vs témoins;  $p = 0,31$  vs contrôles).

**Histologie.** Un exemple de coloration de thymus par la méthode de Mann-Dominici est présenté dans la figure 46. Les résultats de l'analyse sont présentés dans le tableau 13. Celui-ci montre qu'en coupe transversale, la zone médullaire occupe environ 20% de l'organe. Cette valeur semble indépendante du sexe et ne paraît pas être influencée par le traitement expérimental.

	Surface relative (%) de la zone médullaire	
	Femelles	Mâles
<b>Témoins</b>	23,8 ± 1,7	20,9 ± 0,1
<b>Contrôles</b>	22,9 ± 2,7	21,6 ± 2,5
<b>Obstruction nasale</b>	20,8 ± 2,4	19,7 ± 1,7

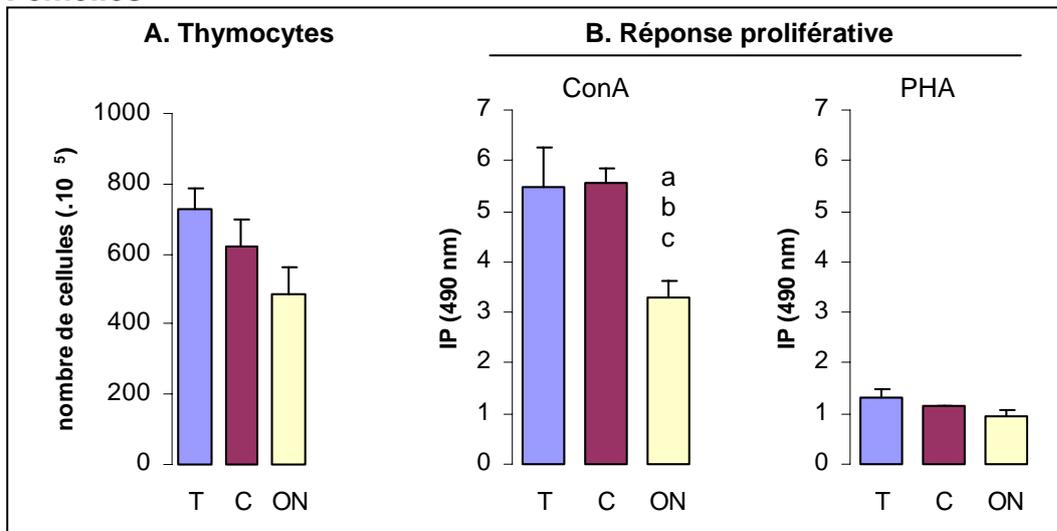
**Tableau 13.** Surface relative (%) de la zone médullaire thymique chez les animaux témoins, contrôles et obstruction nasale de 21 jours.  $m \pm SEM$ .  $n = 3$  thymus / groupe / sexe. Aucun test statistique n'a pu être réalisé du fait des effectifs trop faibles.

**Nombre de thymocytes et réponse proliférative.** La figure 47 montre que le nombre de thymocytes et la réponse proliférative à la PHA ne sont pas affectés par l'obstruction nasale (respectivement  $F = 1,93$ ;  $p = 0,10$  et  $F = 2,24$ ;  $p = 0,07$ ). Il existe en revanche une différence significative pour la réponse proliférative des thymocytes à la ConA non seulement entre les groupes expérimentaux, mais également entre les sexes ( $F = 2,19$ ;  $p = 0,05$ ). Les femelles ON présentent ainsi une diminution de la réponse proliférative des thymocytes à la ConA comparée aux femelles témoins et contrôles (respectivement  $p = 0,01$  et  $p = 0,02$ ). Cette différence ne se retrouve pas chez les mâles dont les thymocytes présentent une réponse à la ConA comparable à celle des mâles témoins et contrôles (respectivement  $p = 0,49$  et  $p = 0,86$ ). Les mâles du groupe ON présentent en outre une réponse proliférative à la ConA significativement plus importante que leurs homologues femelles ( $p = 0,02$ ). Enfin, aucune différence significative n'est observée entre les individus témoins et contrôles, et ce quel que soit le sexe des individus ( $0,10 < p < 0,93$ ).

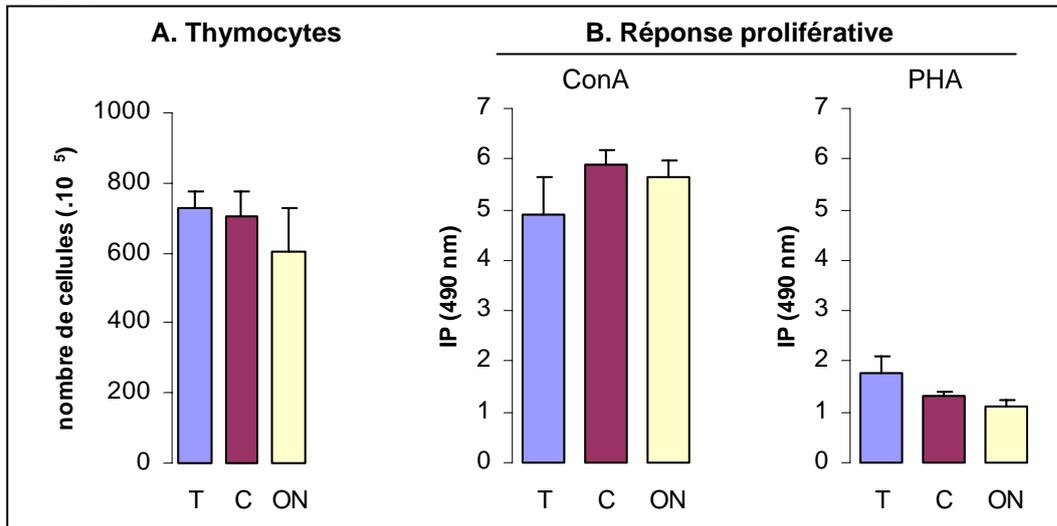


**Figure 46.** Exemple de coloration des thymus par la méthode de Mann-Dominici chez une femelle contrôle de 21 jours. (A) grossissement 10 x 2,5 et (B) grossissement 10 x 6,3.

### Femelles



### Mâles



**Figure 47.** Nombre total de thymocytes (A) et réponse proliférative des thymocytes à la ConA et à la PHA (B) chez les animaux témoins (T), contrôles (C) et obstruction nasale (ON) de 21 jours. IP : indice de prolifération.  $m \pm SEM$ .  $n = 8$  rats / groupe / sexe. Analyse de l'ANOVA à 2 facteurs (effet sexe \* traitement), réponse à la ConA :  $F = 2,19$  à 2 degrés de liberté,  $p = 0,049$ . Analyse du PLSD de Fisher, <sup>a</sup>  $p < 0,05$  comparé aux témoins; <sup>b</sup>  $p < 0,05$  comparé aux contrôles; <sup>c</sup>  $p < 0,05$  comparé aux homologues mâles.

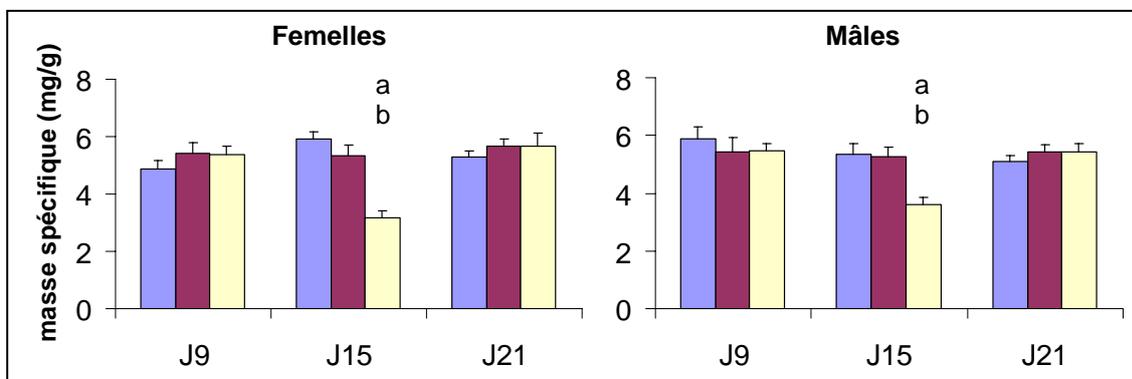
#### 5.4.3.2 Impacts sur la rate

**Masse spécifique.** En ce qui concerne la masse splénique (figure 48), l'analyse statistique révèle une différence significative entre les lots expérimentaux à J15 uniquement (J9 :  $F = 0,81$ ,  $p = 0,55$ ; J15 :  $F = 12,14$ ,  $p < 0,0001$ ; J21 :  $F = 1,88$ ,  $p = 0,12$ ). Les animaux de 15 jours exposés à l'obstruction nasale présentent ainsi une atrophie de la rate aussi bien chez les femelles ( $p < 0,0001$  vs témoins et contrôles) que chez les mâles ( $p = 0,0004$  vs témoins et contrôles). Comparativement aux contrôles, le pourcentage de réduction est de 40 % chez les femelles et de 32 % chez les mâles. D'autre part, les individus témoins et contrôles arborent une masse splénique comparable indépendamment de leur âge ou de leur sexe ( $0,09 < p < 0,93$ ).

**Nombre de splénocytes et réponse proliférative.** La figure 49 (au verso) montre que le nombre total de splénocytes n'a pas été affecté par l'obstruction nasale précoce ( $F = 1,20$ ;  $p = 0,32$ ). En revanche, il y a une différence significative en ce qui concerne la réponse proliférative des splénocytes ( $F = 2,44$ ,  $p = 0,05$  pour la ConA;  $F = 3,29$ ,  $p = 0,01$  pour la PHA). Celle-ci est en effet diminuée suite à l'induction de l'obstruction nasale chez les femelles (ConA :  $p = 0,03$  vs témoins; PHA :  $p = 0,007$  vs témoins;  $p = 0,0009$  vs contrôles). Il n'y a toutefois aucune différence significative entre les femelles C et ON pour la ConA ( $p = 0,09$ ). Chez les mâles exposés à l'obstruction nasale, la réponse proliférative est également diminuée mais uniquement avec la ConA ( $p = 0,03$  vs témoins;  $p = 0,03$  vs contrôles) et non avec la PHA ( $p = 0,12$  vs témoins;  $p = 0,16$  vs contrôles). Enfin, la réponse proliférative des splénocytes est comparable entre les animaux témoins et contrôles ( $0,28 < p < 0,91$ ) et entre les sexes dans un même groupe expérimental ( $0,22 < p < 0,90$ ).

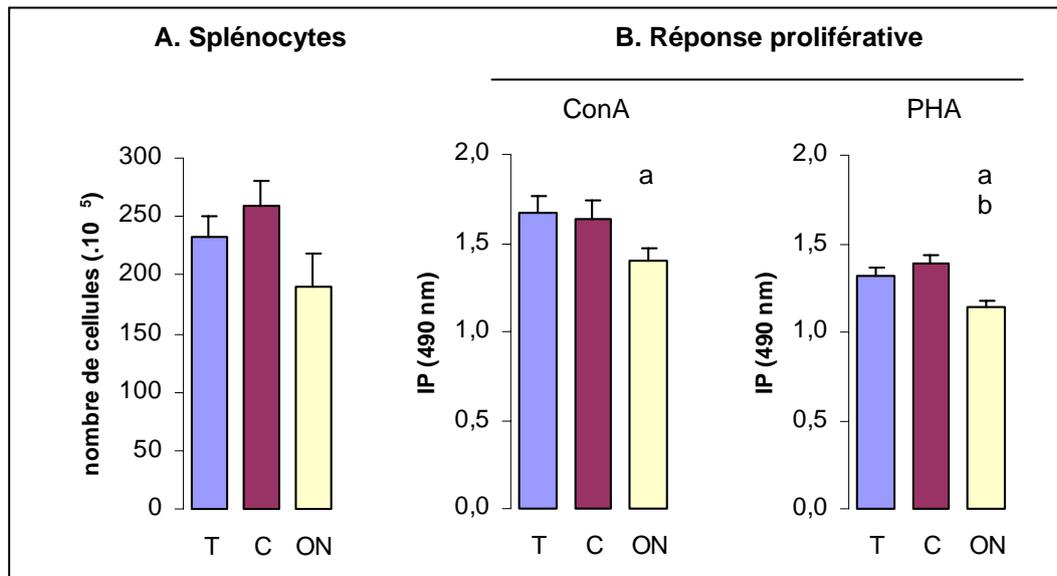
#### 5.4.4 Résumé

Nos résultats montrent que l'obstruction nasale est associée à des changements immunitaires impliquant aussi bien les organes lymphoïdes primaire que secondaire. Ainsi, à la fin de la période d'obstruction nasale, les organes lymphoïdes étudiés présentent une diminution de leurs masses spécifiques. En ce qui concerne la rate, cette différence est abolie le 21<sup>ème</sup> jour postnatal, soit six jours après la réouverture des narines. L'atrophie spécifique du thymus se maintient en revanche jusqu'au 21<sup>ème</sup> jour chez les femelles alors que l'on ne constate plus aucune différence significative chez les individus mâles. Cette diminution de masse spécifique est associée à une réponse proliférative des thymocytes / splénocytes amoindrie chez les animaux ON de 21 jours. On ne constate toutefois aucune réduction du nombre de cellules. En accord avec les résultats concernant la masse des organes, la baisse de réactivité des thymocytes concerne

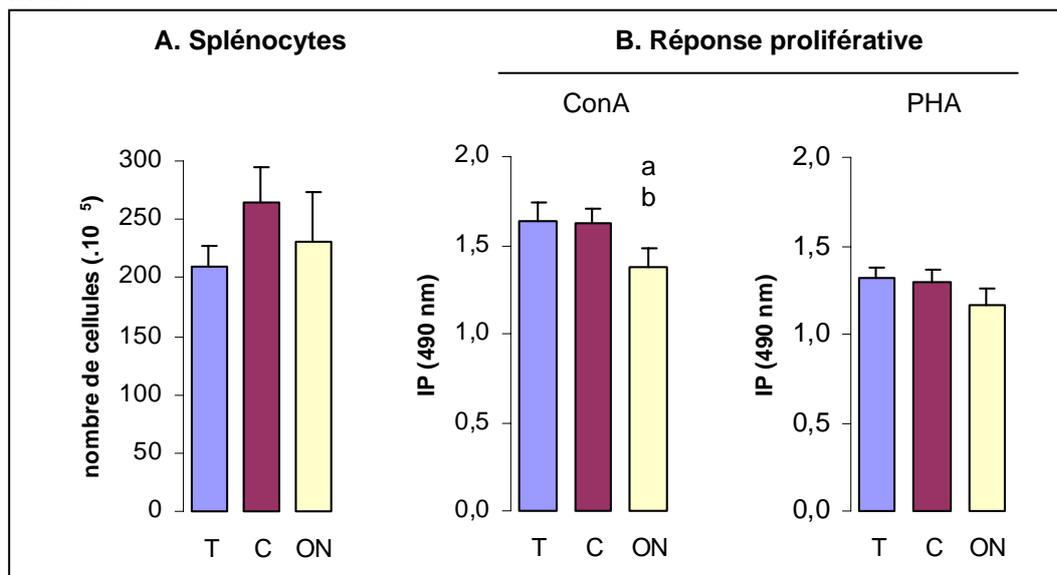


**Figure 48.** Masse spécifique de la rate à 9, 15 et 21 jours chez les animaux témoins, contrôles et obstruction nasale.  $m \pm \text{SEM}$ .  $n = 8$  rats / groupe / âge / sexe. J : jour postnatal. Analyse de l'ANOVA à 2 facteurs (effet traitement), J15 :  $F = 12,14$  à 2 degrés de liberté,  $p < 0,0001$ . Analyse du PLSD de Fisher, <sup>a</sup>  $p < 0,001$  comparé aux témoins; <sup>b</sup>  $p < 0,001$  comparé aux contrôles.

## Femelles



## Mâles



**Figure 49.** Nombre total de splénocytes (A) et réponse proliférative des splénocytes à la ConA et à la PHA (B) chez les animaux témoins (T), contrôles (C) et obstruction nasale (ON) de 21 jours. IP : indice de prolifération.  $m \pm SEM$ .  $n = 8$  rats / groupe / sexe. J : jour postnatal. Analyse de l'ANOVA à 2 facteurs (effet traitement), réponse à la ConA :  $F = 2,44$  à 2 degrés de liberté,  $p = 0,046$ ; réponse à la PHA :  $F = 3,29$  à 2 degrés de liberté,  $p = 0,012$ . Analyse du PLSD de Fisher, <sup>a</sup>  $p < 0,05$  comparé aux témoins; <sup>b</sup>  $p < 0,05$  comparé aux contrôles.

uniquement les femelles qui présentent un indice de prolifération significativement plus faible que leurs homologues mâles. Les impacts immunologiques de l'obstruction nasale, en termes de récupération après la réouverture des narines, semblent donc plus marqués chez les femelles.

## 5.5 Discussion

### 5.5.1 Obstruction nasale, respiration buccale et muscles oro-faciaux

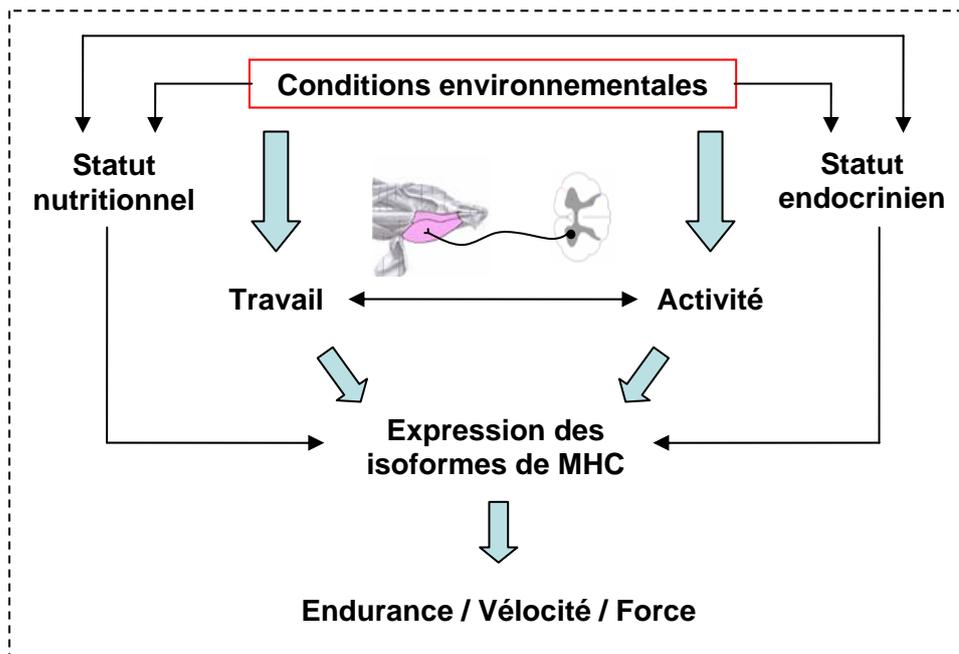
Dans les secondes suivant l'obstruction des narines, on constate la mise en place d'une suppléance buccale afin de maintenir la fonction ventilatoire. La respiration buccale nouvellement établie se traduit alors par une ouverture périodique de la bouche (Schlenker *et al.*, 2000). Le rythme d'ouverture augmente progressivement jusqu'au 11<sup>ème</sup> jour postnatal, diminue ensuite de façon graduelle avant de chuter brutalement à J14, jour correspondant à la réouverture des narines.

Deux facteurs non exclusifs doivent être pris en compte pour expliquer les modifications observées entre le 8<sup>ème</sup> et le 13<sup>ème</sup> jour postnatals : la maturation des mécanismes permettant l'établissement d'une voie aérienne buccale et le degré de détresse respiratoire engendré par l'obstruction de la filière nasale. En effet, les études chez la brebis montrent qu'en cas d'obstruction nasale, les perturbations de l'homéostasie gazeuse du sang sont plus marquées chez le nouveau-né (Harding *et al.*, 1987). Ce résultat peut être expliqué par une immaturité des mécanismes nerveux permettant l'établissement et le maintien de la respiration buccale (Miller, 1985; Harding et Wood, 1990). La capacité à maintenir une voie aérienne buccale augmente ainsi avec l'âge du fait de la maturation des chémorécepteurs sanguins d'une part, et des mécanorécepteurs des voies aériennes d'autre part (Harding *et al.*, 1995).

De plus, l'obstruction des narines entraîne une détresse respiratoire qui pourrait atteindre son maximum le 11<sup>ème</sup> jour postnatal. Cette hypothèse est notamment soutenue par les travaux montrant que chez le rat adulte, les modifications de l'homéostasie gazeuse du sang s'aggrave dans les 72h suivant l'obstruction des narines (Erkan *et al.*, 1994). Par ailleurs, les animaux exposés à l'obstruction nasale présentent un taux de mortalité maximal à J11 (cf. chapitre 3, p.44). Ces résultats soutiennent donc l'hypothèse d'une mort liée à la détresse respiratoire comme suggéré par Erkan et ses collaborateurs (1994). Quoi qu'il en soit, l'absence de respiration nasale et les mouvements mandibulaires liés à respiration buccale constituent des modifications de conditions de travail influençant le développement des muscles oro-faciaux.

Ainsi, l'obstruction nasale est associée à une diminution de la croissance du masséter superficiel et du *levator nasolabialis*. Les masses spécifiques du diaphragme et du digastrique antérieur ne sont en revanche pas modifiées. D'autre part, l'obstruction nasale et l'ouverture chronique de la bouche entraînent des modifications de la répartition en isoformes de MHC dans tous les muscles oro-faciaux étudiés chez les mâles et uniquement dans le masséter superficiel chez les femelles. De nombreux facteurs sont susceptibles d'influencer le développement musculaire suite à l'induction d'une obstruction nasale expérimentale (figure 50). En modifiant de façon spécifique l'activité électromyographique des muscles oro-faciaux, les variations de conditions de travail constituent sans doute le facteur déterminant les changements muscle-spécifiques constatés dans notre étude. De plus, l'obstruction nasale est susceptible d'entraîner de nombreuses conditions pouvant affecter de manière systémique les muscles squelettiques. Ainsi, la privation alimentaire et les modifications endocriniennes sont connues pour leurs effets sur le développement du système musculaire. Ces facteurs pourraient ainsi favoriser ou, au contraire, contrecarrer les effets spécifiques liés aux modifications de conditions de travail.

Le premier point concerne l'atrophie spécifique du masséter superficiel et du *levator nasolabialis* qui pourrait résulter des altérations nutritionnelles et endocriniennes observées chez les animaux exposés à l'obstruction nasale. En effet, il est à présent bien établi que la privation alimentaire peut induire, ou aggraver, les atrophies musculaires (Lecker *et al.*, 2004). La diminution de la prise énergétique altère par exemple plusieurs indices de croissance musculaire comme la taille totale et l'aire de section transversale (Lewis et Sieck, 1992). D'autre part, nos résultats montrent que la respiration buccale forcée est associée à des niveaux élevés de corticostérone et à des niveaux faibles d'hormones thyroïdiennes. Les glucocorticoïdes ont un effet catabolique sur les muscles squelettiques (Seene et Viru, 1982). Cet effet est lié à une diminution de la synthèse des protéines myofibrillaires, à une augmentation de leur catabolisme et à une réduction des stocks protéiques (Seene *et al.*, 2003). On sait par ailleurs qu'au cours du développement postnatal du rat, l'hypothyroïdisme entraîne un retard de maturation du masséter superficiel qui présente alors une réduction du diamètre des fibres musculaires (Ganji et Behzadi, 2007). En résumé, les éventuelles carences nutritionnelles associées aux niveaux élevés de corticostérone et aux faibles concentrations d'hormones thyroïdiennes pourraient expliquer, au moins en partie, l'atrophie observée dans le *levator nasolabialis* et le masséter superficiel des animaux exposés à l'obstruction nasale.



**Figure 50.** Illustration schématique des principales voies par lesquelles les variations de conditions environnementales sont susceptibles d'influencer la répartition en isoformes de chaînes lourdes de myosine (MHC) des muscles squelettiques. Cette composition a un impact fonctionnel important sur l'endurance, la vitesse et la force développées par les muscles.

Le fait que la masse relative du digastrique antérieur, lié à l'ouverture de la mâchoire, ne soit pas affectée alors que l'on observe une atrophie spécifique du masséter superficiel, lié à la fermeture de la mâchoire, souligne l'influence des conditions de travail sur la croissance musculaire. En effet, l'ouverture chronique de la bouche est associée à une augmentation de l'activité électromyographique des muscles supra-hyoïdiens tel que le digastrique antérieur tandis que l'activité du masséter se trouve au contraire inhibée (Ono *et al.*, 1998; Hiyama *et al.*, 2003). De telles modifications de l'activité électromyographique sont connues pour influencer la masse musculaire (Roy *et al.*, 1991). Ainsi, une stimulation électrique quotidienne prévient l'atrophie liée à l'immobilisation chez le lapin (Qin *et al.*, 1997). Dans notre modèle expérimental, ces variations d'activité électromyographique suffiraient à expliquer l'ensemble des résultats concernant les modifications de masse musculaire. En effet, l'atrophie spécifique du masséter superficiel et du *levator nasolabialis* pourrait être la conséquence de la baisse d'activité neuromusculaire démontrée pour les muscles lié à la fermeture de la mâchoire et aux flairages lors du passage à la respiration buccale (Ono *et al.*, 1998; Shi *et al.*, 1998). De plus, la stimulation électrique accrue démontrée dans les muscles supra-hyoïdiens (Hiyama *et al.*, 2003) pourrait compenser les effets atrophiants du déficit nutritionnel, des glucocorticoïdes et de l'hypothyroïdisme sur le digastrique antérieur (Qin *et al.*, 1997). Enfin, notre travail révèle que la masse du diaphragme n'est pas affectée par six jours d'obstruction nasale. Ceci est en accord avec les travaux d'Ono *et al.* (1998) qui montrent que l'obstruction nasale ne modifie pas l'activité électromyographique du diaphragme chez le chat.

Le second point concerne la composition en isoformes de MHC. Quel que soit le groupe expérimental, seules des isoformes caractéristiques d'individus adultes ont été observées à 21 jours. Ce résultat est en accord avec la littérature qui montre que dans le diaphragme de rat (Zhan *et al.*, 1998) et le masséter de souris (Usami *et al.*, 2003), l'expression des isoformes périnatales de MHC disparaît graduellement au cours du développement postnatal. En particulier, Zhan et ses collaborateurs ont montré que la MHC<sub>p</sub> disparaissait totalement du diaphragme de rat entre le 14<sup>ème</sup> et le 28<sup>ème</sup> jour postnatal. Notre étude ne révèle aucune trace de MHC<sub>p</sub> dans le diaphragme à 21 jours, il semble donc que chez le rat, la disparition complète de cette isoforme intervienne entre le 14<sup>ème</sup> et le 21<sup>ème</sup> jour postnatal. De nombreuses études ont rapporté des modifications de la composition en isoformes de MHC sous des conditions physiologiques et pathologiques variées, mais cela n'avait jamais été démontré suite à l'induction d'une obstruction nasale. Ces variations de répartition des isoformes de MHC ont un impact important sur les propriétés énergétiques et contractiles des fibres musculaires (Sieck et Regnier, 2001). En effet, les fibres exprimant la MHC<sub>1</sub> sont plus résistantes à la fatigue bien qu'elles

gènèrent une force spécifique maximale et une vitesse de contraction inférieures aux fibres exprimant les isoformes de type 2. Parmi ces fibres à contraction rapide, celles exprimant la  $MHC_{2b}$  possèdent une plus grande force spécifique maximale, une vitesse de contraction plus rapide mais sont moins durables que les fibres exprimant les  $MHC_{2x}$  et  $MHC_{2a}$ .

En accord avec ces observations, nos résultats montrent que le muscle lié à la fermeture de la mâchoire, à savoir le masséter superficiel, est plus durable chez les individus exposés à l'obstruction nasale puisque l'expression de la  $MHC_{2b}$  y est diminuée. Chez les mâles, le même phénomène est observé pour le digastrique antérieur. En revanche, le *levator nasolabialis* des mâles exposés à l'obstruction nasale exprime davantage de  $MHC_{2b}$  et moins de  $MHC_{2a}$ , il est donc moins résistant à la fatigue. Par conséquent, le masséter superficiel des femelles et l'ensemble des muscles oro-faciaux étudiés chez les mâles présentent un profil en MHC adapté au passage à la respiration buccale, facilitant ainsi la respiration.

Ces commutations d'isoformes de MHC peuvent être en partie expliquées par certains changements spécifiques d'activité électromyographique. En effet, une activation électrique de longue durée accroît la proportion de fibres I au détriment des fibres II (Windisch *et al.*, 1998). On constate à l'inverse des transitions vers des fibres II lors de périodes d'activité réduite (Edgerton *et al.*, 1995). La stimulation et l'inhibition respectives des activités neuromusculaires du digastrique antérieur et du *levator nasolabialis* pourraient donc expliquer les commutations d'isoformes de MHC observés dans ces deux muscles chez les mâles ON. Cependant, la bibliographie rapporte une inhibition de l'activité électromyographique du masséter suite à l'induction d'une obstruction nasale chez le chat (Ono *et al.*, 1998). En partant du principe que l'activité du masséter soit effectivement inhibée chez les rats exposés à l'obstruction nasale, la diminution relative de la  $MHC_{2b}$  observée dans le masséter de ces animaux peut paraître surprenante. En fait, Van Wessel *et al.* (2005) ont récemment montré que le masséter superficiel et le digastrique antérieur présentaient des différences d'activité électromyographique au cours de l'activité quotidienne chez le lapin. Le masséter superficiel présente en effet une distribution bimodale des bouffées d'activité. Les auteurs interprètent leurs résultats comme la conséquence d'une activité posturale additionnelle pour le masséter. Dans les muscles posturaux, l'absence d'activité peut entraîner une diminution de la proportion de  $MHC_{2b}$  (Pette et Staron, 2000). Le résultat observé pour le masséter superficiel des animaux ON ne semble donc pas en désaccord avec l'hypothèse d'une influence des variations d'activité électromyographique sur la composition en isoformes de MHC.

Par ailleurs, le statut hormonal des individus est sans doute impliqué dans les modifications structurelles observées suite à l'induction de l'obstruction nasale. Ainsi, les glucocorticoïdes produisent des changements spécifiques dans l'expression des isoformes de MHC : les fibres de type 2b sont plus sensibles à l'effet catabolique des glucocorticoïdes (Kelly et Goldspink, 1982) et cet effet spécifique pourrait expliquer la diminution relative de la MHC<sub>2b</sub> dans le masséter superficiel et le digastrique antérieur. D'autant plus que chez les mâles, seule l'expression relative de cette isoforme est touchée par l'obstruction nasale. Par ailleurs, les hormones thyroïdiennes jouent un rôle essentiel dans le développement des muscles squelettiques (d'Albis *et al.*, 1990). Elles stimulent par exemple la transition vers les isoformes adultes en anticipant l'expression de la MHC<sub>2b</sub> au cours du développement postnatal (Butler-Browne *et al.*, 1990). En résumé, la réduction du niveau d'hormones thyroïdiennes et l'augmentation du niveau de corticostérone constatées chez les animaux du groupe obstruction nasale pourraient expliquer les transitions vers des isoformes plus résistantes à la fatigue observées dans le masséter superficiel et, pour les mâles, dans le digastrique antérieur.

Enfin, nos résultats montrent que dans les muscles mandibulaires, la structure musculaire diffère en fonction du sexe des individus. Il s'agit d'un résultat peu surprenant dans la mesure où les muscles masticatoires de plusieurs espèces de mammifères sont sexuellement dimorphiques à l'âge adulte du point de vue de leurs compositions en MHC. C'est par exemple le cas chez le cochon d'inde (Lyons *et al.*, 1986), le lapin (English *et al.*, 1999), la souris (Eason *et al.*, 2000) et le macaque rhésus (Maxwell *et al.*, 1979). Nos résultats montrent que chez le rat, ce dimorphisme sexuel est présent dès le 21<sup>ème</sup> jour postnatal. Concernant le digastrique antérieur, l'obstruction nasale n'interfère pas avec les différences observées entre les sexes. En revanche, dans le masséter superficiel, le dimorphisme sexuel est inversé suite à l'induction de l'obstruction nasale : contrairement à ce qui est observé chez les individus témoins et contrôles, les mâles ON présentent plus de MHC<sub>2b</sub> que leurs homologues femelles. En fait, bien que l'obstruction nasale entraîne une diminution de MHC<sub>2b</sub> dans les deux sexes, cette réduction est nettement plus marquée chez les femelles ( $p < 0,0001$ ) que chez les mâles ( $p = 0,024$  vs contrôles). Cette réponse supérieure suffit à expliquer l'inversion du dimorphisme sexuel dans le masséter superficiel suite à l'induction de l'obstruction nasale.

En conclusion, l'obstruction nasale peut modifier la structure des muscles oro-faciaux. En effet, chez les animaux exposés à l'obstruction nasale, les muscles associés aux mouvements mandibulaires présentent une diminution de l'expression relative de l'isoforme 2b, moins résistante à la fatigue. Cet effet est observé dans les deux sexes pour le masséter superficiel et uniquement chez les mâles pour le digastrique antérieur.

Ces modifications de structure tendent à augmenter l'endurance des muscles liés aux mouvements de la mâchoire, facilitant ainsi la mise en place de la respiration buccale. Il nous reste cependant à préciser les facteurs impliqués dans cette adaptation. Il serait ainsi judicieux de mesurer l'activité électro-myographique des muscles oro-faciaux suite à l'induction de l'obstruction nasale chez le rat.

#### 5.5.2 Obstruction nasale, prise alimentaire et croissance

Nos résultats montrent que la prise alimentaire est fortement affectée par l'obstruction nasale. À J9, les portées exposées à l'obstruction nasale présentent une plus grande latence du premier événement alimentaire, un raccourcissement de la durée moyenne de ces événements et une diminution du taux d'attachement aux mamelles. Ces modifications se traduisent par une réduction de la quantité de lait ingéré et par un ralentissement de la croissance visible sur la période J9 - J15. Il est bien établi que l'olfaction joue un rôle de premier plan dans l'expression du comportement alimentaire. Chez le jeune rat, l'orientation vers les mamelles est dépendante d'une phéromone, le bisulfite diméthyle (Blass et Teicher, 1980). La bulbectomie olfactive entraîne ainsi des difficultés d'orientation vers les mamelles et une diminution du taux d'attachement aux mamelles (Singh et Tobach, 1975; Risser et Slotnick, 1987).

Puisque les mères des portées exposées à l'obstruction nasale sont présentes au nid et s'occupent correctement de leurs jeunes, nous suggérons que la réduction de la prise alimentaire serait plutôt liée à la privation olfactive qui entraînerait des difficultés d'orientation vers les mamelles. Cette hypothèse est soutenue par le fait que, comme démontré précédemment, les jeunes exposés à l'obstruction nasale présentent une perturbation de l'orientation vis-à-vis de l'environnement familial. D'autre part, il a été montré que l'établissement de la posture d'allaitement et que l'éjection de lait étaient dépendants des stimuli tactiles en provenance de la progéniture (Stern et Johnson, 1990). Dans les portées ON de 9 jours, le taux d'attachement aux mamelles est fortement corrélé avec la durée de l'évènement alimentaire. Le manque de stimuli en provenance de la portée pourrait donc inciter les mères à interrompre prématurément l'allaitement.

Par ailleurs, le faible taux d'attachement aux mamelles constaté dans les portées ON est sans doute en partie lié à la compétition entre les processus respiratoire et alimentaire (Erkan *et al.*, 1994). Du fait de l'obstruction des narines, une respiration buccale forcée se met en place. Par conséquent, la nécessité de maintenir une voie aérienne buccale doit perturber la saisie orale des mamelles et limiter, d'une part la durée individuelle d'attachement aux mamelles, et d'autre part le rythme d'ingestion du lait maternel.

La prise alimentaire est néanmoins restaurée, voire inversée, à partir du 15<sup>ème</sup> jour postnatal. Les portées exposées à l'obstruction nasale affichent alors une durée totale des événements alimentaires supérieure aux portées témoins et contrôles. Ceci se traduit par une quantité de lait ingéré plus importante chez les mâles de 15 jours exposés à l'obstruction nasale. La même tendance statistique observée chez les femelles ON de 15 jours. Cet accroissement de la prise alimentaire est associé à une récupération graduelle du retard de croissance. En effet, trois jours après la réouverture des narines (J18), la masse pondérale des individus exposés à l'obstruction nasale est de nouveau comparable à celle des animaux témoins et contrôles. Malgré cette évolution parallèle, la réduction de la prise alimentaire n'est sans doute pas le seul facteur à l'origine du retard de croissance observé chez les jeunes exposés à l'obstruction nasale. Ainsi, la sécrétion accrue de glucocorticoïdes devrait entraîner une utilisation supérieure des réserves énergétiques. De plus, une augmentation de la dépense énergétique liée à une hyperactivité et/ou à des problèmes de thermorégulation pourrait également être impliquée dans le retard de croissance observé chez les animaux exposés à l'obstruction nasale. En effet, il est à présent bien établi que l'activation de l'axe corticotrope est associée à une hyperactivité (Cao *et al.*, 2007) et nos résultats sur l'apprentissage spatial indiquent que les animaux exposés à l'obstruction nasale présentent une hyperactivité locomotrice dans le labyrinthe en épi. De plus, le regroupement des jeunes au sein du nid est en partie lié aux signaux olfactifs (Brunjes et Alberts, 1979) et l'obstruction nasale, en perturbant l'orientation vers les congénères pourrait contrarier la recherche de la thermoneutralité. Il serait donc instructif d'examiner l'activité motrice et la thermorégulation comportementale chez les animaux exposés à l'obstruction nasale. Associées à une mesure globale de la dépense énergétique (eau doublement marquée, calorimétrie indirecte...), ces données nous permettraient de définir l'état énergétique des individus.

### 5.5.3 Obstruction nasale, corticostérone et hormones thyroïdiennes

Nos résultats indiquent que l'obstruction nasale précoce est associée à la mise en place d'une réponse neuroendocrine au stress. Notre étude montre en effet une augmentation de la concentration plasmatique en corticostérone 24h après le traitement (J9) et à la fin de la période d'obstruction nasale (J15). Chez les femelles exposées à l'obstruction nasale, la concentration en corticostérone reste significativement supérieure jusqu'au 21<sup>ème</sup> jour postnatal, soit six jours après la réouverture des narines. En revanche, il n'y a plus aucune différence significative entre les mâles de 21 jours. De plus, l'hypertrophie des glandes surrénales, qui est en rapport direct avec l'exposition chronique au stress (Basset et West, 1997), est plus marquée chez les femelles; lesquelles présentent une

masse spécifique des glandes surrénales supérieures à leurs homologues mâles de 21 jours. Par conséquent, nous pouvons en conclure qu'une obstruction nasale réalisée entre le 8<sup>ème</sup> et le 15<sup>ème</sup> jour postnatal entraîne une réponse au stress dont l'intensité est dépendante du sexe et qui perdure au moins jusqu'à 21 jours chez les femelles.

D'autre part, quel que soit l'âge et le sexe considérés, les concentrations en corticostérone et la masse des glandes surrénales sont comparables entre les animaux témoins et contrôles. Ceci suggère que la mise en place de la réponse au stress chronique est bien liée à l'obstruction des narines et non aux autres composantes de la procédure, à savoir l'hypothermie, la cautérisation, le réchauffement et la séparation maternelle de 45 min. Enfin, les individus témoins et contrôles présentent une évolution de la concentration en corticostérone en accord avec les données bibliographiques qui mentionnent un taux bas entre le 2<sup>ème</sup> et le 14<sup>ème</sup> jour postnatal suivi d'une augmentation à J15 et J21 (Vazquez, 1998).

La littérature rapporte de façon constante une réponse adrénalienne plus élevée chez les femelles suite à l'induction d'un stress chronique. Il a par exemple été montré que l'isolement maternel entraînait une élévation plus importante du niveau de corticostérone plasmatique chez les jeunes femelles, bien que l'augmentation du niveau d'ACTH soit semblable dans les deux sexes (Knuth et Etgen, 2005). Il serait ainsi intéressant de mesurer les niveaux d'ACTH plasmatique suite à l'induction d'une obstruction nasale précoce afin de savoir si l'augmentation de la corticostérone est liée à une activation centrale de la réponse au stress ou à une augmentation de la sensibilité adrénalienne à l'ACTH. Cette régulation sexe-spécifique de la réponse adrénalienne pourrait être liée à la présence d'androgènes testiculaires chez les mâles même au cours des premières semaines de vie (Yoshimura *et al.*, 2003). Cette hypothèse est notamment soutenue par l'étude de Gaskin et Kitay (1970) montrant qu'une castration pré-pubertaire effectuée chez de jeunes rats augmente la réponse hormonale au stress physique, un résultat abrogé par une simple injection de testostérone. D'autre part, il faut souligner l'importance que pourrait avoir les soins maternels dans la régulation sexe-spécifique de la réponse au stress (Champagne *et al.*, 2003). En effet, les mères passent plus de temps à lécher la région ano-génitale des jeunes mâles (Moore et Morelli, 1979) et le léchage ano-génital apparaît particulièrement efficace pour maintenir la concentration en corticostérone à un niveau relativement bas au cours du développement postnatal des rongeurs (Vazquez, 1998; Van Oers *et al.*, 1999). Dans notre étude, un léchage maternel dépendant du sexe pourrait donc expliquer le fait que la réponse neuroendocrine au stress soit plus marquée chez les femelles exposées à l'obstruction nasale.

Deux hypothèses peuvent être avancées pour expliquer le fait que la concentration en corticostérone reste élevée chez les femelles de 21 jours malgré la réouverture des narines : la persistance d'autres facteurs de stress et/ou l'incapacité des jeunes femelles à interrompre rapidement la réponse adrénaliennne. Goldman et ses collaborateurs (1973) ont effectivement décrit une réponse adrénaliennne prolongée chez des rats juvéniles exposés à un facteur de stress aigu. Ainsi, à la manière de ce qui est observé chez les rats sénescents, chez lesquels l'incapacité à achever la réponse au stress est liée à une baisse du nombre de récepteurs aux glucocorticoïdes au niveau de l'hippocampe (Sapolsky *et al.*, 1983), il se pourrait que les animaux juvéniles présentent une immaturité des mécanismes neurorégulateurs permettant d'interrompre rapidement la réponse adrénaliennne (Vazquez, 1998). Ceci peut passer par un ralentissement du métabolisme périphérique de la corticostérone (c'est-à-dire par une demi-vie accrue de la corticostérone et de sa protéine transporteuse - Schapiro *et al.*, 1971; Henning, 1978) ou par une diminution du rétrocontrôle négatif exercé par les glucocorticoïdes sur les éléments centraux de l'axe corticotrope (Vazquez *et al.*, 1996).

Par ailleurs, 24h après le traitement, les individus contrôles présentent une augmentation de la concentration en T3 et une diminution de la concentration en T4. Ces effets sont cependant limités dans le temps puisque aucune différence significative n'est détectée entre les animaux témoins et contrôles de 15 et 21 jours. La procédure a un impact opposé sur les concentrations en T3 et T4 ce qui suggère une altération du métabolisme périphérique des hormones thyroïdiennes. En effet, la T3 est l'hormone thyroïdienne la plus active d'un point de vue métabolique (Kohrle, 1996). Elle peut être synthétisée par la glande thyroïde mais est principalement générée au niveau des tissus périphériques (Visser, 1996). La majeure partie de la T4, hormone exclusivement produite par la thyroïde, est convertie en T3 au niveau de la thyroïde et des tissus périphériques (Kelly, 2000). Différents facteurs sont susceptibles d'exacerber la conversion périphérique de la T4 en T3 parmi lesquels l'exposition au froid. Celle-ci entraîne en effet une activation du système nerveux sympathique qui, au travers l'augmentation de la sécrétion de catécholamines, accélère la conversion de la T4 en T3 (Silva et Larsen, 1983). L'hypothermie, la brûlure et la séparation maternelle de courte durée pourraient donc constituer une situation stressante aiguë qui, par l'intermédiaire des catécholamines, augmenterait la conversion périphérique de la T4.

Chez les individus exposés à l'obstruction nasale, on constate une diminution des concentrations en hormones thyroïdiennes touchant aussi bien la T4 que la T3. En effet, l'obstruction nasale est associée à une diminution des concentrations en T4 à J9 et J15, alors que l'on observe une diminution de la concentration en T3 à J21. Vingt-quatre heures

après le traitement, la baisse de la concentration en T4 est significativement plus importante chez les femelles ON comparées à leurs homologues mâles. Les facteurs susceptibles d'être impliqués dans ces modifications sont nombreux. Parmi ceux-ci, la privation alimentaire et la sécrétion associée de glucocorticoïdes pourraient expliquer l'hypothyroïdisme constaté chez les animaux exposés à l'obstruction nasale. En effet, Diano *et al.* (1998) et Kasdallah *et al.* (2005) ont rapportés un impact suppressif de la privation nutritionnelle sur les concentrations en T4 et en T3. Ces effets semblent en partie véhiculés par l'activation de l'axe corticotrope (Benker *et al.*, 1990). Cependant, nos résultats ne montrent pas de réduction significative du niveau de T3 avant le 21<sup>ème</sup> jour postnatal. Ceci pourrait être expliqué par un effet masquant lié à une activation sympathique. Celle-ci augmenterait la conversion périphérique de la T4, contrecarrant momentanément la diminution de la concentration en T3. L'obstruction nasale proprement dite et la procédure associée auraient donc des effets synergiques sur la concentration en T4 et antagonistes sur la concentration en T3.

La diminution supérieure de la concentration en T4 chez les femelles ON de 9 jours paraît plus difficile à expliquer au vu de nos résultats. Les niveaux de corticostérone étant comparables à cet âge, cette différence pourrait être expliquée par une activation sympathique supérieure chez les femelles. Celle-ci entraînerait un taux de conversion T4 → T3 supérieur chez les femelles exposées à l'obstruction nasale. Dans le cas où cette hypothèse se révélerait exacte, on devrait néanmoins observer un niveau de T3 supérieur à neuf jours chez les femelles exposées à l'obstruction nasale. Etant donné que les niveaux de T3 plasmatiques des femelles et des mâles ON sont comparables, l'hypothèse nécessite donc une utilisation accrue de la T3 chez les femelles ON. Il est donc difficile de déterminer avec exactitude les mécanismes sous-jacents aux modifications thyroïdiennes observées suite à l'induction de l'obstruction nasale. En effet, seules les fractions libres d'hormones thyroïdiennes ont été examinées dans cette étude et il serait sans doute intéressant de doser les fractions liées aux protéines transporteuses.

Dans tous les cas, seules les hormones thyroïdiennes libres sont actives d'un point de vue biologique et les modifications observées pourraient se traduire par divers effets délétères tels qu'un défaut de maturation du système nerveux central (Koibuchi et Iwasaki, 2006) ou encore une diminution du métabolisme basal et de la thermogénèse (Silva, 2003).

En résumé, nos résultats montrent que l'obstruction nasale est associée à la mise en place d'une réponse neuroendocrine au stress et à une diminution des concentrations en thyroxine et en triiodothyronine. En termes de récupération après la réouverture des narines, alors que les capacités olfactives et la prise alimentaire se rétablissent rapidement,

les modifications endocriniennes se maintiennent au moins jusqu'au 21<sup>ème</sup> jour postnatal, soit six jours après la réouverture des narines. En ce qui concerne l'axe corticotrope, cette récupération semble par ailleurs plus lente chez les femelles qui pourraient présenter des difficultés à interrompre rapidement la réponse adrénalienne. Dans tous les cas, le niveau élevé de glucocorticoïdes constaté chez les femelles de 21 jours est sans doute impliqué dans les différences anatomiques et physiologiques observées à cet âge entre les femelles et les mâles exposés à l'obstruction nasale. Ainsi, le maintien de la réponse au stress pourrait expliquer le fait que les femelles soient les seules à présenter une atrophie des bulbes olfactifs, une atrophie du thymus et une réduction de la réponse proliférative des thymocytes à 21 jours.

#### 5.5.4 Obstruction nasale, organes lymphoïdes et réponse proliférative

Nos résultats montrent que l'obstruction nasale est associée à des changements immunitaires impliquant aussi bien les organes lymphoïdes primaires que secondaires. Ainsi, à la fin de la période d'obstruction nasale, les organes lymphoïdes étudiés présentent une diminution de leurs masses spécifiques. En ce qui concerne la rate, cette différence est abolie le 21<sup>ème</sup> jour postnatal, soit six jours après la réouverture des narines. L'atrophie spécifique du thymus se maintient en revanche jusqu'au 21<sup>ème</sup> jour chez les femelles alors que l'on ne constate plus aucune différence significative chez les individus mâles. Cette diminution de masse spécifique est associée à une réponse proliférative des splénocytes / thymocytes amoindrie chez les animaux ON de 21 jours bien que l'on ne constate pas de réduction du nombre de cellules. En accord avec les résultats concernant la masse des organes, la baisse de réactivité des thymocytes concerne uniquement les femelles qui présentent un indice de prolifération significativement plus faible que leurs homologues mâles. Les impacts immunologiques de l'obstruction nasale, en termes de récupération après la réouverture des narines, semblent donc plus marqués chez les femelles.

Différents facteurs pourraient influencer le développement des organes lymphoïdes suite à l'induction d'une obstruction nasale précoce. Celle-ci est en effet associée à une réduction de la prise alimentaire susceptible d'entraîner une atrophie du thymus (Chandra, 1991; Howard *et al.*, 1999). Cet impact de la privation alimentaire sur la masse thymique pourrait être véhiculé, au moins en partie, par la sécrétion accrue de glucocorticoïdes et/ou par la diminution des concentrations en T4 et T3. Classiquement, on considère que les hormones thyroïdiennes ont un impact stimulant sur le système immunitaire (Fabris *et al.*, 1995). L'injection de T4 se traduit ainsi par une augmentation du nombre de thymocytes sans doute liée à une stimulation de leur prolifération (Villa-

Verde *et al.*, 1993). D'autre part, la réponse surrénalienne à l'obstruction nasale tend à se prolonger davantage chez les individus femelles. Ceci pourrait expliquer le fait que chez celles-ci, l'atrophie spécifique du thymus se maintienne jusqu'à 21 jours. D'autant plus que les femelles exposées à l'obstruction nasale présentent une baisse de l'activité proliférative des thymocytes, non seulement par rapport aux femelles témoins et contrôles, mais également par rapport à leurs homologues mâles. Le thymus est un organe particulièrement sensible aux glucocorticoïdes. Ceux-ci provoquent notamment un accroissement de l'apoptose des thymocytes (Tarcic *et al.*, 1998; Dreau *et al.*, 1999). Par ailleurs, de nombreux auteurs ont démontré l'impact dépressif de différents types de stress sur la prolifération des thymocytes à court terme (Groer *et al.*, 2002) comme à long terme (Shanks *et al.*, 2000). En résumé, la baisse de prolifération, associée à une éventuelle apoptose des thymocytes, pourrait expliquer la diminution de la masse thymique observée à 15 et/ou 21 jours chez les animaux exposés à l'obstruction nasale.

Chez les femelles, les effets délétères de l'obstruction nasale sur la réponse proliférative des thymocytes n'apparaissent qu'avec le mitogène ConA. Soppi (1981) a démontré que la réponse aux mitogènes des thymocytes dépendait de leur degré de maturation, les thymocytes matures coopérant mieux avec la ConA qu'avec la PHA. De plus, les études en cytométrie de flux révèlent que dans les premières semaines de vie, les jeunes rats présentent une augmentation du nombre de cellules  $CD_4^+CD_8^+$  au détriment des cellules  $CD_4^-CD_8^-$  moins matures (Capri *et al.*, 2000). Par conséquent, nous pouvons supposer que les cellules touchées par l'obstruction nasale seraient plutôt des thymocytes ayant atteint un certain degré de maturité. Toutefois, l'étude histologique semble indiquer que l'atrophie affecte de manière similaire les zones corticale et médullaire thymiques. Tous les thymocytes, quel que soit leur stade de maturation, pourraient donc être touchés par l'obstruction nasale. Des investigations complémentaires sont donc nécessaires afin de déterminer l'abondance relative des sous-populations de thymocytes suite à l'induction d'une obstruction nasale. Dans tous les cas, cet impact sur la fonctionnalité des thymocytes pourrait entraîner une diminution du répertoire des lymphocytes T périphériques et avoir un impact négatif sur l'immunité spécifique.

Le thymus n'est pas le seul organe lymphoïde à être touché par l'obstruction nasale. Nos résultats révèlent en effet une diminution temporaire de la masse splénique à 15 jours et une réduction de la réponse proliférative des splénocytes à 21 jours. Chez les rongeurs, la privation nutritionnelle se traduit par une atrophie de la rate et par une baisse de la réponse proliférative *in vitro* des lymphocytes spléniques (Howard *et al.*, 1999; Cunha *et al.*, 2003). Ces effets sont réduits, voire annihilés, par l'administration exogène de leptine suggérant un rôle central des concentrations en leptine circulante dans la pathogenèse de

l'atrophie lymphoïde induite par la privation nutritionnelle (Howard *et al.*, 1999). En effet, la leptine est connue pour sa capacité à réduire les effets de la privation nutritionnelle sur les axes thyroïdiens et corticotrope et pourrait, par ce biais, moduler les impacts immunitaires de la sous-nutrition (Ahima *et al.*, 1996; Howard *et al.*, 1999).

Quoi qu'il en soit, les effets de la privation alimentaire sur la rate sont sans doute véhiculés par des modifications neuroendocriniennes impliquant la mise en place de la réponse au stress. Les impacts du stress sur la masse splénique restent néanmoins très controversés dans la littérature. En effet, la plupart des auteurs ne décrivent aucun effet du stress sur la masse de la rate (Van Raaij *et al.*, 1996; Dhabhar *et al.*, 1997) tandis que quelques-uns rapportent une diminution (Domingez-Gerpe et Rey-Mendez, 1997). En fait, la rate contient de nombreuses catégories de lymphocytes et de cellules sanguines. Par conséquent, le stress peut agir sur la masse splénique au travers au moins deux processus distincts : une réponse à court terme *via* le recrutement temporaire des érythrocytes suite à l'activation du système nerveux sympathique (Knudsen *et al.*, 1995), et une réponse à moyen ou long terme *via* une diminution de la réponse proliférative des lymphocytes suite à l'augmentation du taux de glucocorticoïdes (Dreau *et al.*, 1999). Ce second mécanisme reste néanmoins débattu puisque certaines études ne trouvent pas de modification de l'activité proliférative des splénocytes suite à l'induction d'un stress (Teunis *et al.*, 2002). À l'inverse, Groer *et al.* (2002) rapportent que 3h de séparation maternelle quotidienne de J6 à J10 entraîne une baisse de la réponse proliférative des splénocytes à la ConA. Ce résultat est inversé par une simulation de la stimulation tactile maternelle soulignant ainsi le rôle important des soins maternels dans le maintien de l'homéostasie au cours du développement postnatal.

Nos résultats révèlent une réduction de la réponse proliférative des splénocytes suite à l'induction de l'obstruction nasale. Cette diminution est observée avec les deux mitogènes chez les femelles et uniquement avec la ConA chez les mâles. La baisse de la réactivité des splénocytes pourrait donc être impliquée dans l'atrophie de la rate constatée chez les animaux ON de 15 jours. Cependant, le fait que la baisse de la masse splénique apparaisse comme un phénomène transitoire suggère l'intervention du système nerveux sympathique. Une activation sympathique pourrait également être impliquée dans les différences de réponse observées entre les splénocytes et les thymocytes chez les mâles. En effet, la portion efférente du système de réponse au stress comprend non seulement l'activation des glandes corticosurrénales par l'ACTH, mais également la stimulation des médullosurrénales par le système sympathique. Le système nerveux sympathique est notamment connu pour provoquer la sécrétion de catécholamines par les glandes médullosurrénales. Xie *et al.* (2002) ont démontré que les catécholamines inhibaient

la prolifération des splénocytes et la production d'IL-2, facteur de croissance essentiel aux cellules T. Par conséquent, il serait sans doute intéressant de mesurer les niveaux de catécholamines et la production d'IL-2 suite à l'induction d'une obstruction nasale précoce. Ceci permettrait de préciser les mécanismes impliqués dans la réduction de la réponse proliférative des splénocytes.

En conclusion, nos résultats montrent que comparées à leurs homologues mâles, les femelles sont plus affectées par l'obstruction nasale précoce. Cette différence concerne la masse thymique et la réponse proliférative des thymocytes qui, chez les femelles, restent affectées jusqu'à 21 jours malgré la réouverture des narines. Ce résultat pourrait être expliqué par l'importance de la réponse surrénalienne observée chez les femelles. D'autre part, la diminution des réponses prolifératives des splénocytes et des thymocytes pourrait être associée à une plus grande susceptibilité aux maladies chez les animaux exposés à l'obstruction nasale. Ceci pourrait avoir de sérieuses conséquences à court comme à long terme sur la santé des individus. Il serait maintenant intéressant d'approfondir nos connaissances des mécanismes qui sous-tendent les modifications immunitaires constatées suite à l'induction de l'obstruction nasale.

# 6

## Conclusion et perspectives



## 6 Conclusion et perspectives

L'obstruction nasale se traduit par une cascade d'évènements touchant de façon ultime le système immunitaire. La chronologie exacte de ces évènements, les interactions entre les différents facteurs et l'implication relative de ces facteurs restent néanmoins à déterminer. En cas de perturbation du statut nutritionnel, il est désormais bien établi que la leptine constitue un facteur clé régulant aussi bien l'homéostasie énergétique (Morton *et al.*, 2005) que les fonctions neuroendocriniennes (Haynes *et al.*, 1997). Au cours du développement postnatal, le lait maternel représente une source importante de leptine (Walker *et al.*, 2004) et sa concentration pourrait donc être altérée chez les animaux exposés à l'obstruction nasale. On sait que l'administration exogène de leptine tend à réduire les effets de la privation nutritionnelle sur les axes corticotrope et thyroïdien (Ahima *et al.*, 1996). Cette hormone possède en outre des actions pléiotropiques sur le système immunitaire. Elle constitue par exemple un signal prolifératif dans la lymphopoïèse (Palmer *et al.*, 2006), elle augmente la survie, la maturation et la prolifération des lymphocytes T (Papathanassoglou *et al.*, 2006), réduit l'apoptose des cellules B et réduit les effets atrophiant de la privation nutritionnelle sur les organes lymphoïdes (Howard *et al.*, 1999). Par conséquent, il serait sans doute intéressant de doser les niveaux plasmatiques de leptine chez les animaux exposés à l'obstruction nasale. De plus, une administration exogène de leptine nous permettrait de préciser l'implication relative de la privation nutritionnelle dans les diverses conséquences de l'obstruction nasale précoce.

En effet, le travail expérimental présenté dans ce mémoire ne permet pas de distinguer les impacts imputables à l'appauvrissement de l'environnement olfactif, à la détresse respiratoire, à la privation nutritionnelle, aux glucocorticoïdes et à l'hypothyroïdisme. Même si dans la plupart des cas ces impacts sont sans doute synergiques, de nombreuses études complémentaires seraient nécessaires afin de préciser les effets relatifs des différents facteurs. Par exemple, il apparaît indispensable de réaliser une étude dynamique de l'homéostasie gazeuse du sang afin d'évaluer le degré de détresse respiratoire engendrée par l'obstruction des narines. Afin de déterminer l'influence des glucocorticoïdes, il faudrait pouvoir limiter leur synthèse avec une substance comme la métopirone ou inhiber leurs récepteurs par un antagoniste telle que la mifépristone. Le dosage des hormones hypothalamiques (CRH et TRH) et hypophysaires (ACTH et TSH) permettrait en outre de préciser les mécanismes sous-jacents aux variations de concentrations en corticostérone et en hormones thyroïdiennes.

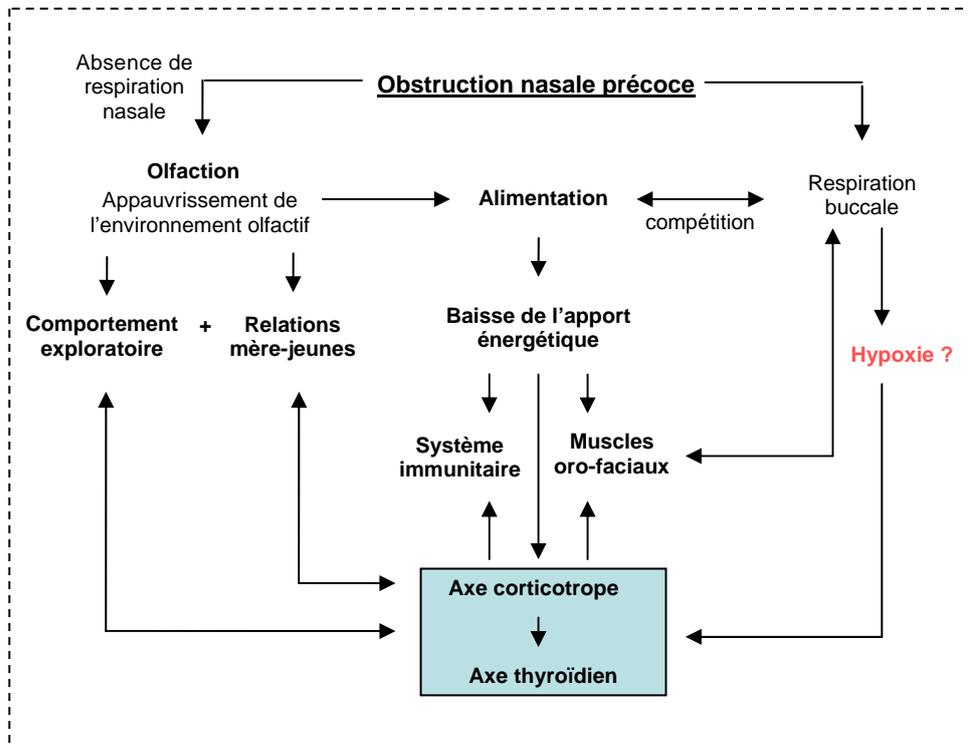
De nombreuses études comportementales peuvent également être envisagées. Ainsi, les mères des portées exposées à l'obstruction nasale perçoivent la détresse de leur progéniture mais la nature des signaux mis en jeu reste à déterminer. Par ailleurs, nos résultats sur le comportement exploratoire suggèrent que les animaux exposés à l'obstruction nasale présentent un niveau d'anxiété supérieur aux individus témoins et contrôles (cf. chapitre 4, p.59). Les propriétés anxiogènes de l'obstruction nasale précoce mériteraient donc d'être mises en évidence en testant les animaux dans un labyrinthe en croix surélevé. Cependant, nos études sur l'orientation par rapport au nid et sur l'apprentissage spatial montrent qu'il est souvent difficile de mettre en place des tests comportementaux adaptés à la niche écologique et à la maturation neuro-comportementale des jeunes rats.

Quoi qu'il en soit, un examen de l'activité locomotrice et de la thermorégulation comportementale donnerait des indices intéressants quant à la dépense énergétique des animaux exposés à l'obstruction nasale. En effet, la balance énergétique est sans doute perturbée par l'obstruction nasale précoce. Les systèmes musculaire et immunitaire constituent deux composantes importantes de la dépense énergétique en termes de croissance, d'activité et de turnover protéique. Les atrophies musculaire et lymphoïde constatée suite à l'induction de l'obstruction nasale peuvent donc être envisagées comme un processus adaptatif visant à faire face à la demande énergétique accrue associée au stress. Lors d'une situation stressante, il y a en effet compétition entre la croissance et la résistance à la perturbation pour l'utilisation des ressources énergétiques. Il est toutefois difficile, voire impossible, de déterminer si les atrophies observées suite à l'induction de l'obstruction nasale représentent un mécanisme adaptatif visant à économiser l'énergie ou un symptôme traduisant un état pathologique. En admettant que les modifications engendrées par l'obstruction nasale soient réversibles, celles-ci pourraient effectivement constituer un processus adaptatif facilitant la survie de l'individu. Dans le cas contraire, le caractère adaptatif des modifications ne serait que transitoire du fait de la réouverture des narines. Pour prendre l'exemple de la composition en MHC des muscles oro-faciaux, ceux-ci présentent un profil en MHC adapté à la respiration buccale mais qui, du fait du retour à une respiration nasale normale, correspond en fait à un phénotype en inadéquation avec la demande environnementale. Il apparaît donc essentiel de prolonger notre étude jusqu'à l'âge adulte afin de déterminer la réversibilité des conséquences de l'obstruction nasale précoce.

En effet, nos résultats montrent qu'une obstruction nasale réalisée du 8<sup>ème</sup> au 15<sup>ème</sup> jour postnatal a des conséquences qui perdurent au moins jusqu'à 21 jours. L'obstruction nasale précoce est donc susceptible d'avoir un retentissement à plus ou moins long terme. On sait que les expériences précoces, et notamment les expériences stressantes, peuvent

avoir des conséquences qui perdurent jusqu'à l'âge adulte. Ainsi, la séparation maternelle et la sous-nutrition postnatales peuvent perturber les fonctions neuroendocriniennes de l'adulte en modulant par exemple l'activité de l'axe corticotrope, de l'axe somatotrope ou encore la sécrétion d'insuline (Harel et Tannenbaum, 1995; Anisman *et al.*, 1998; Houdijk *et al.*, 2003). Par ailleurs, l'hypothyroïdisme et l'hypercorticotéronémie postnatales sont susceptibles d'avoir des conséquences permanentes sur l'organisation et le fonctionnement du système nerveux central (Wingfield et Ramenofsky, 1999; Mussa *et al.*, 2001). L'excès de glucocorticoïdes peut également avoir des conséquences à long terme sur la réponse des cellules immunitaires aux situations stressantes (Bamberger *et al.*, 1996). De façon intéressante, il semble que les altérations immunitaires constatées suite à l'exposition à des facteurs de stress conventionnels (choc électrique, contrainte physique, manipulations par l'expérimentateur, nage ou course forcées...) soient rapidement réversibles après l'arrêt de la situation stressante (Shurin *et al.*, 1994; Dhabhar *et al.*, 1995). En revanche, l'exposition à des facteurs de stress sociaux (séparation maternelle chez le jeune ou conflits sociaux chez le mâle adulte) semble avoir des conséquences immunitaires à long-terme comme par exemple une réduction persistante de la prolifération des cellules T (Stefanski et Engler, 1999). L'obstruction nasale, qui implique des facteurs de stress sociaux, a des impacts immunitaires qui perdurent au moins jusqu'à 21 jours. Par conséquent, il serait sans doute intéressant d'examiner la lymphoprolifération chez des rats adultes ayant été exposés à une obstruction nasale précoce.

En conclusion, l'obstruction nasale se traduit par une hypertrophie des glandes surrénales, par une hypercorticotéronémie et par des perturbations immunitaires qui perdurent après la réouverture des narines. Ces modifications sont plus marquées chez les femelles. L'obstruction nasale précoce pourrait donc constituer un modèle de stress postnatal intéressant. La compréhension des relations liant le stress et les systèmes physiologiques périphériques nécessite en effet la mise au point de modèles expérimentaux. Bien que ce modèle d'obstruction nasale puisse apparaître comme caricatural, il offre néanmoins des conditions standardisées permettant de comparer valablement des groupes expérimentaux à des groupes témoins. En tant que modèle de stress postnatal, l'obstruction nasale présente l'avantage d'être plus proche des conditions pathologiques rencontrées dans la nature que des modèles conventionnels tels que la contrainte physique ou la manipulation par l'expérimentateur. Finalement, le travail expérimental exposé dans ce mémoire montre que l'obstruction nasale précoce perturbe l'équilibre de l'individu (figure 51). Cette procédure constitue néanmoins une situation multi-factorielle et il apparaît difficile d'appréhender les interactions et l'importance relative des différents facteurs. Ceux-ci peuvent agir de manière synergique ou antagoniste, systémique ou spécifique afin d'adapter l'individu aux nouvelles contraintes de l'environnement.



**Figure 51.** Schéma récapitulatif des conséquences comportementales et physiologiques de l'obstruction nasale précoce : relations hypothétiques entre les différents facteurs.

L'absence de respiration nasale et la respiration buccale chronique perturbent la prise alimentaire ce qui se traduit par une baisse de l'apport énergétique et une perturbation de l'équilibre hormonal. Outre la privation olfactive, la détresse respiratoire est également connue pour ses effets sur le système neuroendocrinien. Le degré de détresse respiratoire engendré par l'obstruction nasale reste néanmoins à déterminer. L'appauvrissement de l'environnement olfactif altère l'expression de certains comportements. Les modifications comportementales, nutritionnelles et hormonales affecteraient finalement le système immunitaire et les muscles oro-faciaux.

## Références bibliographiques



## Références bibliographiques

1. **Agarwal, S.K., Marshall, G.D. Jr., 2001.** Stress effects on immunity and its application to clinical immunology. *Clin. Exp. Allergy*. 31, 25-31.
2. **Agnish, N.D., Keller, K.A., 1997.** The rationale for culling of rodent litters. *Fundam. Appl. Toxicol.* 38, 2-6.
3. **Ahima, R.S., Prabakaran, D., Mantzoros, C., Qu, D., Lowell, B., Maratos-Flier, E., Flier, J.S., 1996.** Role of leptin in the neuroendocrine response to fasting. *Nature* 382, 250-252.
4. **Alberts, J.R., Brunjes, P.C., 1978.** Ontogeny of thermal and olfactory determinants of huddling in the rat. *J. Comp. Physiol. Psychol.* 92, 897-906.
5. **Andreau, K., Lemaire, C., Souvannavong, V., Adam, A., 1998.** Induction of apoptosis by dexamethasone in the B cell lineage. *Immunopharmacology* 40, 67-76.
6. **Anisman, H., Zaharia, M.D., Meaney, M.J., Merali, Z., 1998.** Do early-life events permanently alter behavioral and hormonal responses to stressors? *Int. J. Dev. Neurosci.* 16, 149-164.
7. **Arrati, P.G., Carmona, C., Dominguez, G., Beyer, C., Rosenblatt, J.S., 2005.** GABA receptor agonists in the medial preoptic area and maternal behavior in lactating rats. *Physiol. Behav.* 87, 51-65.
8. **Ashwell, J.D., Lu, F.W., Vacchio, M.S., 2000.** Glucocorticoids in T cell development and function. *Annu. Rev. Immunol.* 18, 309-345.
9. **Asmussen, G., Schmalbruch, I., Soukup, T., Pette, D., 2003.** Contractile properties, fiber types, and myosin isoforms in fast and slow muscles of hyperactive Japanese waltzing mice. *Exp. Neurol.* 184, 758-766.
10. **Bamberger, C.M., Schulte, H.M., Chrousos, G.P., 1996.** Molecular determinants of glucocorticoid receptor function and tissue sensitivity to glucocorticoids. *Endocr. Rev.* 17, 245-261.
11. **Bär, A., Pette, D., 1988.** Three fast myosin heavy chains in adult rat skeletal muscle. *FEBS Lett.* 235, 153-155.

12. **Bardo, M.T., Donohew, R.L., Harrington, N.G., 1996.** Psychobiology of novelty seeking and drug seeking behavior. *Behav. Brain Res.* 77, 23-43.
13. **Barnett, S.A., Cowan, P.E., Radford, G.G., Prakash, I., 1975.** Peripheral anosmia and the discrimination of poisoned food by *Rattus rattus* L. *Behav. Biol.* 13, 183-190.
14. **Basset, J.R., West, S.H., 1997.** Vascularization of adrenal cortex: its possible involvement of steroid hormone release. *Microscopy Research and Technique* 36, 546-557.
15. **Bateman, A., Singh, A., Kral, T., Solomon, S., 1989.** The immune-hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Endocr. Rev.* 10, 92-112.
16. **Bauer, S., Rasika, S., Han, J., Mauduit, C., Raccurt, M., Morel, G., Jourdan, F., Benahmed, M., Moyse, E., Patterson, P.H., 2003.** Leukemia inhibitory factor is a key signal for injury-induced neurogenesis in the adult mouse olfactory epithelium. *J. Neurosci.* 23, 1792-1803.
17. **Benker, G., Raida, M., Olbricht, T., Wagner, R., Reinhardt, W., Reinwein, D., 1990.** TSH secretion in Cushing's syndrome: relation to glucocorticoid excess, diabetes, goitre, and the 'sick euthyroid syndrome'. *Clin. Endocrinol. (Oxf).* 33, 777-786.
18. **Bérubé, L., 1991.** Terminologie de neuropsychologie et de neurologie du comportement, *Montréal, Les Éditions de la Chenelière Inc.* p. 8.
19. **Besedovsky, H.O., Del Rey, A., 1996.** Immune-neuro-endocrine interactions: facts and hypotheses. *Endocr. Rev.* 17, 64-102.
20. **Bingman, V.P., Sharp, P.E., 2006.** Neuronal implementation of hippocampal-mediated spatial behavior: a comparative evolutionary perspective. *Behav. Cogn. Neurosci. Rev.* 5, 80-91.
21. **Blalock, J.E., 1994.** The syntax of immune-neuroendocrine communication. *Immunol. Today.* 15, 504-511
22. **Blass, E.M., Teicher, M.H., 1980.** Suckling. *Science* 210, 15-22.
23. **Blaugrund, S.M., 1989.** Nasal obstruction. The nasal septum and concha bullosa. *Otolaryngol. Clin. North Am.* 22, 291-306.

24. **Bodey, B., Bodey, B. Jr, Siegel, S.E., Kaiser, H.E., 1999.** Molecular biological ontogenesis of the thymic reticulo-epithelial cell network during the organization of the cellular microenvironment. *In Vivo* 13, 267-294.
25. **Bottinelli, R., Schiaffino, S., Reggiani, C., 1991.** Force-velocity relations and myosin heavy chain isoform compositions of skinned fibres from rat skeletal muscle. *J. Physiol.* 437, 655-672.
26. **Branchi, I., Bichler, Z., Berger-Sweeney, J., Ricceri, L., 2003.** Animal models of mental retardation: from gene to cognitive function. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 27, 141-153.
27. **Brewster, J., Leon, M., 1980.** Relocation of the site of mother-young contact: maternal transport behavior in Norway rats. *J. Comp. Physiol. Psychol.* 94, 69-79.
28. **Brinon, J.G., Crespo, C., Weruaga, E., Martinez-Guijarro, F.J., Aijon, J., Alonso, J.R., 2001.** Bilateral olfactory deprivation reveals a selective noradrenergic regulatory input to the olfactory bulb. *Neuroscience* 102, 1-10.
29. **Brouette-Lahlou, I., Godinot, F., Vernet-Maury, E., 1999.** The mother rat's vomeronasal organ is involved in detection of dodecyl propionate, the pup's preputial gland pheromone. *Physiol. Behav.* 66, 427-436.
30. **Brouette-Lahlou, I., Vernet-Maury, E., Chanel, J., 1991.** Is rat-dam licking behavior regulated by pups' preputial gland secretion ? *Animal learning and behaviour* 19, 177-184.
31. **Brouette-Lahlou, I., Vernet-Maury, E., Vigouroux, M., 1992.** Role of pups' ultrasonic calls in a particular maternal behavior in Wistar rat: pups' anogenital licking. *Behav. Brain Res.* 50, 147-154.
32. **Brown, R.E., 1982.** Preferences of pre- and post-weanling Long-Evans rats for nest odors. *Physiol. Behav.* 29, 865-874.
33. **Brudzynski, S.M., 2005.** Principles of rat communication: quantitative parameters of ultrasonic calls in rats. *Behav. Genet.* 35, 85-92.
34. **Brunjes, P., Shurling, D.C., 2003.** Cell death in the nasal septum of normal and naris-occluded rats. *Brain Res. Dev. Brain Res.* 146, 25-28.

35. **Brunjes, P.C., 1994.** Unilateral naris closure and olfactory system development. *Brain Res. Brain Res. Rev.* 19, 146-160.
36. **Brunjes, P.C., Alberts, J.R., 1979.** Olfactory stimulation induces filial preferences for huddling in rat pups. *J. Comp. Physiol. Psychol.* 93, 548-555.
37. **Brunjes, P.C., Smith-Crafts, L.K., McCarty, R., 1985.** Unilateral odor deprivation: effects on the development of olfactory bulb catecholamines and behavior. *Brain Res.* 354, 1-6.
38. **Buchman, C.A., Doyle, W.J., Swarts, J.D., Bluestone, C.D., 1999.** Effects of nasal obstruction on Eustachian tube function and middle ear pressure. *Acta. Otolaryngol.* 119, 351-355.
39. **Burdach, K.J., Doty, R.L., 1987.** The effects of mouth movements, swallowing, and spitting on retronasal odor perception. *Physiol. Behav.* 41, 353-356.
40. **Butler-Browne, G.S., Barbet, J.P., Thornell, L.E., 1990.** Myosin heavy and light chain expression during human skeletal muscle development and precocious muscle maturation induced by thyroid hormone. *Anat. Embryol. Berl.* 181, 513-522.
41. **Cannizzaro, E., Martire, M., Gagliano, M., Plescia, F., La Barbera, M., Mantia, G., Mineo, A., Cannizzaro, G., Cannizzaro, C., 2005.** Reversal of prenatal diazepam-induced deficit in a spatial-object learning task by brief, periodic maternal separation in adult rats. *Behav. Brain Res.* 161, 320-330.
42. **Cao, L., Hudson, C.A., Moynihan, J.A., 2007.** Chronic foot shock induces hyperactive behaviors and accompanying pro- and anti-inflammatory responses in mice. *J. Neuroimmunol.* 186, 63-74.
43. **Capri, M., Quaglino, D., Verzella, G., Monti, D., Bonafe, M., Cossarizza, A., Troiano, L., Zecca, L., Pasquali-Ronchetti, I., Franceschi, C., 2000.** A cytofluorimetric study of T lymphocyte subsets in rat lymphoid tissues (thymus, lymph nodes) and peripheral blood: a continuous remodelling during the first year of life. *Exp. Gerontol.* 35, 613-625.
44. **Cavo, J.W., Kawamoto, S., Berlin, B.P., Zollinger, W., Ogura, J.H., 1975.** Arterial blood gas changes following nasal packing in dogs. *Laryngoscope* 85, 2055-2068.

45. **Champagne, F.A., Francis, D.D., Mar, A., Meaney, M.J., 2003.** Variations in maternal care in the rat as a mediating influence for the effects of environment on development. *Physiol. Behav.* 79, 359-371.
46. **Chandra, R.K., 1991.** Immunocompetence is a sensitive and functional barometer of nutritional status. *Acta Paediatr. Scand. Suppl.* 374, 129-132.
47. **Chrousos, G.P., 1998.** Stressors, stress, and neuroendocrine integration of the adaptive response. The 1997 Hans Selye Memorial Lecture. *Ann. NY Acad. Sci.* 851, 311-335.
48. **Chrousos, G.P., Gold, P.W., 1992.** The concepts of stress and stress system disorders. Overview of physical and behavioral homeostasis. *JAMA* 267, 1244-1252.
49. **Churchill, S.E., Shackelford, L.L., Georgi, J.N., Black, M.T., 2004.** Morphological variation and airflow dynamics in the human nose. *Am. J. Hum. Biol.* 16, 625-638.
50. **Cole, P., 2003.** The four components of the nasal valve. *Am. J. Rhinol.* 17, 107-110.
51. **Connor, T.J., Harkin, A., Kelly, J.P., Leonard, B.E., 2000.** Olfactory bulbectomy provokes a suppression of interleukin-1beta and tumour necrosis factor-alpha production in response to an in vivo challenge with lipopolysaccharide: effect of chronic desipramine treatment. *Neuroimmunomodulation* 7, 27-35.
52. **Coopersmith, R., Leon, M., 1984.** Enhanced neural response to familiar olfactory cues. *Science* 225, 849-851.
53. **Coppola, D.M., Coltrane, J.A., Arsov, I., 1994.** Retronasal or internasal olfaction can mediate odor-guided behaviors in newborn mice. *Physiol. Behav.* 56, 729-736.
54. **Cornwell-Jones, C., Sobrian, S.K., 1977.** Development of odor-guided behavior in Wistar and Sprague-Dawley rat pups. *Physiol. Behav.* 19, 685-688.
55. **Coureaud, G., Schaal, B., Langlois, D., Perrier, G., 2001.** Responsiveness of newborn rabbits to surface odour cues from females differing in lactational state and to milk. *Animal behaviour* 72, 263-269.
56. **Cummings, D.M., Brunjes, P.C., 1997.** The effects of variable periods of functional deprivation on olfactory bulb development in rats. *Exp. Neurol.* 148, 360-366.
57. **Cummings, D.M., Henning, H.E., Brunjes, P.C., 1997.** Olfactory bulb recovery after early sensory deprivation. *J. Neurosci.* 17, 7433-7440.

58. **Cunha, W.D., Friedler, G., Vaisberg, M., Egami, M.I., Costa Rosa, L.F., 2003.** Immunosuppression in undernourished rats: the effect of glutamine supplementation. *Clin. Nutr.* 22, 453-457.
59. **Cupic, B., Breljak, D., Gabrilovac, J., 2005.** Receptor-mediated down-regulation of neutral endopeptidase (NEP; EC 3.4.24.11; CD10) on immature B lymphocytes by dexamethasone. *Int. J. Mol. Med.* 15, 1023-1031.
60. **Cvetnic, V., Cvetnic, S., Grabac, I., 1981.** Temporary artificial obstruction of the nose and changes in gas exchange in the blood. *Laryngoscope* 91, 1001-1009.
61. **D'Albis, A., Butler-Browne, G., 1993.** The hormonal control of myosin isoform expression in skeletal muscle of mammals : a review. *BAM* 3, 7-16.
62. **D'Albis, A., Chanoine, C., Janmot, C., Mira, J.C., Couteaux, R., 1990.** Muscle-specific response to thyroid hormone of myosin isoform transitions during rat postnatal development. *Eur. J. Biochem.* 193, 155-161.
63. **D'Albis, A., Couteaux, R., Janmot, C., Roulet, A., 1989.** Specific programs of myosin expression in the postnatal development of rat muscles. *Eur. J. Biochem.* 183, 583-590.
64. **Danneman, P.J., Mandrell, T.D., 1997.** Evaluation of five agents/methods for anesthesia of neonatal rats. *Lab. Anim. Sci.* 47, 386-395.
65. **Dawson, P.A., Steane, S.E., Markovich, D., 2005.** Impaired memory and olfactory performance in NaSi-1 sulphate transporter deficient mice. *Behav. Brain Res.* 159, 15-20.
66. **Delp, M.D., Pette, D., 1994.** Morphological changes during fiber type transitions in low-frequency-stimulated rat fast-twitch muscle. *Cell. Tissue Res.* 277, 363-371.
67. **Dhabhar, F.S., McEwen, B.S., Spencer, R.L., 1997.** Adaptation to prolonged or repeated stress. Comparison between rat strains showing intrinsic differences in reactivity to acute stress. *Neuroendocrinology* 65, 360-368.
68. **Dhabhar, F.S., Miller, A.H., McEwen, B.S., Spencer, R.L., 1995.** Effects of stress on immune cell distribution. Dynamics and hormonal mechanisms. *J. Immunol.* 154, 5511-5527.

69. **Dhabhar, F.S., Satoskar, A.R., Bluethmann, H., David, J.R., McEwen, B.S., 2000.** Stress-induced enhancement of skin immune function: A role for gamma interferon. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 2846-2851.
70. **Diano, S., Naftolin, F., Goglia, F., Horvath, T.L., 1998.** Fasting-induced increase in type II iodothyronine deiodinase activity and messenger ribonucleic acid levels is not reversed by thyroxine in the rat hypothalamus. *Endocrinology* 139, 2879-2884.
71. **Dominguez-Gerpe, L., Rey-Mendez, M., 1997.** Time-course of the murine lymphoid tissue involution during and following stressor exposure. *Life Sci.* 61, 1019-1027.
72. **Dreau, D., Sonnenfeld, G., Foxler, N., Morton, D.S., Lyte, M., 1999.** Effects of social conflict on immune responses and E.Coli growth within closed chambers in mice. *Physiol. Behav.* 67, 133-140.
73. **Eason, J.M., Schwartz, G.A., Pavlath, G.K., English, A.W., 2000.** Sexually dimorphic expression of myosin heavy chains in the adult mouse masseter. *J. Appl. Physiol.* 89, 251-258.
74. **Edgerton, V.R., Zhou, M.Y., Ohira, Y., Klitgaard, H., Jiang, B., Bell, G., Harris, B., Saltin, B., Gollnick, P.D., Roy, R.R., 1995.** Human fiber size and enzymatic properties after 5 and 11 days of spaceflight. *J. Appl. Physiol.* 78, 1733-1739.
75. **Egger, G.J., 1973.** The relevance of memory, arousal, and cue factors to developmental changes in spontaneous alternation by rats. *Dev. Psychobiol.* 6, 459-468.
76. **Elenkov, I.J., 2004.** Glucocorticoids and the Th1/Th2 balance. *Ann. NY Acad. Sci.* 1024, 138-146.
77. **Elenkov, I.J., Chrousos, G.P., 1999.** Stress, cytokine patterns and susceptibility to disease. *Baillieres Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* 13, 583-595.
78. **English, A.W., Eason, J., Schwartz, G., Shirley, A., Carrasco, D.I., 1999.** Sexual dimorphism in the rabbit masseter muscle: myosin heavy chain composition of neuromuscular compartments. *Cells Tissues Organs* 164, 179-191.
79. **Erkan, M., Erhan, E., Saglam, A., Arslan, S., 1994.** Compensatory mechanisms in rats with nasal obstructions. *Tokai J. Exp. Clin. Med.* 19, 67-71.

80. **Eskandari, F., Sternberg, E.M., 2002.** Neural-immune interactions in health and disease. *Ann. NY Acad. Sci.* 966, 20-27.
81. **Fabris, N., Mocchegiani, E., Provinciali, M., 1995.** Pituitary-thyroid axis and immune system: a reciprocal neuroendocrine-immune interaction. *Horm. Res.* 43, 29-38.
82. **Fabris, N., 1981.** Influence of thyroid hormones on the immune system. *In: Hesch RD, editor. Low T3 syndrome. Sero Symposium n° 40, London: Academic Press* pp. 199-207.
83. **Farbman, A.I., Brunjes, P.C., Rentfro, L., Michas, J., Ritz, S., 1988.** The effect of unilateral naris occlusion on cell dynamics in the developing rat olfactory epithelium. *J. Neurosci.* 8, 3290-3295.
84. **Farbman, A.I., Buchholz, J.A., 1996.** Transforming growth factor-alpha and other growth factors stimulate cell division in olfactory epithelium in vitro. *J. Neurobiol.* 30, 267-280.
85. **Farrel, W.J., Alberts, J.R. 2002.** Stimulus control of maternal responsiveness to Norway rat (*Rattus norvegicus*) pup ultrasonic vocalizations. *J. Comp. Psychol.* 116, 297-307.
86. **Freitag, K.A., Saker, K.E., Thomas, E., Kalnitsky, J., 2000.** Acute starvation and subsequent refeeding affect lymphocyte subsets and proliferation in cats. *J. Nutr.* 130, 2444-2449.
87. **Fukuhara, K., Kvetnansky, R., Cizza, G., Pacak, K., Ohara, H., Goldstein, D.S., Kopin, I.J., 1996.** Interrelations between sympathoadrenal system and hypothalamo-pituitary-adrenocortical/thyroid systems in rats exposed to cold stress. *J. Neuroendocrinol.* 8, 533-541.
88. **Fukushima, N., Fujita, K., Yokouchi, K., Kawagishi, K., Moriizumi, T., 2004.** Effects of bilateral resection of facial nerves on suckling in developing rats. *Brain Res. Bull.* 62, 385-389.
89. **Gabe, M., 1968.** Techniques histologiques. *Edts Masson et Cie.* pp 247-249.

90. **Galeeva, A., Treuter, E., Tuohimaa, P., Pelto-Huikko, M., 2002.** Comparative distribution of the mammalian mediator subunit thyroid hormone receptor-associated protein (TRAP220) mRNA in developing and adult rodent brain. *Eur. J. Neurosci.* 16, 671-683.
91. **Ganji, F., Behzadi, G., 2007.** Postnatal development of masseteric motoneurons in congenital hypothyroid rats. *Brain Res.* 1129, 81-88.
92. **Ganjian, E., Gannon, P.J., Fliegelman, L.J., Lawson, W., 1999.** Nasal obstruction: an alternative to ostiomeatal complex dysfunction in sinus disease. *Laryngoscope* 109, 1848-1851.
93. **Gaskin, J.H., Kitay, J.I., 1970.** Adrenocortical function in the hamster. Sex differences and effects of gonadal hormones. *Endocrinology* 87, 779-786.
94. **Geiger, P.C., Cody, M.J., Macken, R.L., Sieck, G.C., 2000.** Maximum specific force depends on myosin heavy chain content in rat diaphragm muscle fibers. *J. Appl. Physiol.* 89, 695-703.
95. **Geiger, P.C., Cody, M.J., Sieck, G.C., 1999.** Force-calcium relationship depends on myosin heavy chain and troponin isoforms in rat diaphragm muscle fibers. *J. Appl. Physiol.* 87, 1894-1900.
96. **Gola, R., Cheynet, F., Guyot, L., 2002.** Ophthalmic manifestations of nasal obstruction. *J. Fr. Ophthalmol.* 25, 319-332.
97. **Goldman, L., Winget, C., Hollingshead, G.W., Levine, S., 1973.** Postweaning development of negative feedback in the pituitary-adrenal system of the rat. *Neuroendocrinology* 12, 199-211.
98. **Gomez, G., Atema, J., 1996.** Temporal resolution in olfaction: stimulus integration time of lobster chemoreceptor cells. *J. Exp. Biol.* 199, 1771-1779.
99. **Groer, M.W., Hill, J., Wilkinson, J.E., Stuart, A., 2002.** Effects of separation and separation with supplemental stroking in BALb/c infant mice. *Biol. Res. Nurs.* 3, 119-131.
100. **Hahn, M.E., Lavooy, M.J., 2005.** A review of the methods of studies on infant ultrasound production and maternal retrieval in small rodents. *Behav. Genet.* 35, 31-52.

- 101. Hammond, J., Le, Q., Goodyer, C., Gelfand, M., Trifiro, M., LeBlanc, A., 2001.** Testosterone-mediated neuroprotection through the androgen receptor in human primary neurons. *J. Neurochem.* 77, 1319-1326.
- 102. Harding, R., Buttress, J.A., Caddy, D.J., Wood, G.A., 1987.** Respiratory and upper airway responses to nasal obstruction in awake lambs and ewes. *Respir. Physiol.* 68, 177-188.
- 103. Harding, R., Hooper, S.B., Wood, G.A., 1991.** Initiation of oral breathing in lambs in response to airway obstruction: mechanisms. *J. Appl. Physiol.* 71, 1574-1580.
- 104. Harding, R., Jakubowska, A.E., McCrabb, G.J., 1995.** Postnatal development of responses to airflow obstruction. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 22, 537-543.
- 105. Harding, R., Wood, G.A., 1990.** The role of carotid bodies in the establishment of oral breathing during nasal obstruction in lambs and ewes. *Respir. Physiol.* 80, 71-81.
- 106. Harel, Z., Tannenbaum, G.S., 1995.** Long-term alterations in growth hormone and insulin secretion after temporary dietary protein restriction in early life in the rat. *Pediatr. Res.* 38, 747-753.
- 107. Hartmann, N., Martrette, J.M., Westphal, A., Divry, M., 1999.** Effects of controllable stress on masticatory behavior and muscle structure: partial protective effect of clomipramine. *Eur. J. Pharmacol.* 266, 19-26.
- 108. Haynes, W.G., Sivitz, W.I., Morgan, D.A., Walsh, S.A., Mark, A.L., 1997.** Sympathetic and cardiorenal actions of leptin. *Hypertension* 30, 619-623.
- 109. Hebel, R., Stromberg, M.W., 1976.** Anatomy of the Laboratory Rat. *The Williams & Wilkins Company, Baltimore (eds).* pp 40.
- 110. Henning, S.J., 1978.** Plasma concentrations of total and free corticosterone during development in the rat. *Am. J. Physiol.* 235, 451-456.
- 111. Hiyama, S., Ono, T., Ishiwata, Y., Kuroda, T., Ohyama, K., 2003.** Effects of experimental nasal obstruction on human masseter and suprahyoid muscle activities during sleep. *Angle Orthod.* 73, 151-157.
- 112. Hofer, M.A., Shair, H.N., 1992.** Ultrasonic vocalization by rat pups during recovery from deep hypothermia. *Dev. Psychobiol.* 25, 511-528.

113. Hongo, T., Hakuba, A., Shiota, K., Naruse, I., 2000. Suckling dysfunction caused by defects in the olfactory system in genetic arhinencephaly mice. *Biol. Neonate*. 78, 293-299.
114. Houdijk, M.E., Engelbregt, M.T., Popp-Snijders, C., Delemarre van der Waal, H.A., 2003. Long-term effects of early postnatal food restriction on growth hormone secretion in rats. *JPEN J. Parenter. Enteral. Nutr.* 27, 260-267.
115. Howard, J.K., Lord, G.M., Matarese, G., Vendetti, S., Ghatei, M.A., Ritter, M.A., Lechler, R.I., Bloom, S.R., 1999. Leptin protects mice from starvation-induced lymphoid atrophy and increases thymic cellularity in ob/ob mice. *J. Clin. Invest.* 104, 1051-1059.
116. Hoyk, Z., Szilagy, T., Halasz, N., 1996. Modulation by thyroid hormones of the development of external plexiform layer in the rat olfactory bulb. *Neurobiology* 4, 45-57.
117. Huey, K.A., Bodine, S.C., 1998. Changes in myosin mRNA and protein expression in denervated rat soleus and tibialis anterior. *Eur. J. Biochem.* 256, 45-50.
118. Ingelstedt, S., 1956. Studies on the conditioning of air in the respiratory tract. *Acta Otolaryngol. Suppl.* 131, 1-80.
119. Jackson, C.M., 1925. The effects of inanition and malnutrition upon growth and structure. *Blakiston's Sons and Co. Philadelphia, PA.*
120. Jakubiec-Puka, A., Ciechomska, I., Morga, J., Matusiak, A., 1999. Contents of myosin heavy chains in denervated slow and fast rat leg muscles. *Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol.* 122, 355-362.
121. Janmot, C., D'Albis, A., 1994. Electrophoretic separation of developmental and adult rabbit skeletal muscle myosin heavy chain isoforms: example of application to muscle denervation study. *FEBS Lett.* 353, 13-15.
122. Johnson, B.E., Marsh, J.A., King, D.B., Lillehoj, H.S., Scanes, S.G., 1992. Effects of T3 on expression of T-cell markers and immune function in thyroidectomized white Leghorn chickens. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 199, 104-113.
123. Kalogjera, L., Pegan, B., Petric, V., 1991. Compensatory mechanisms induced by high oropharyngeal airway resistance in rats. *Acta Otolaryngol.* 111, 384-388.

124. **Kasdallah, A.G., Mornagui, B., Gharbi, N., Machghoul, S., El-Fazaa, S., 2005.** Metabolic and endocrine effects of water and/or food deprivation in rats. *CR Biol.* 328, 463-470.
125. **Keck, T., Leiacker, R., Heinrich, A., Kuhnemann, S., Rettinger, G., 2000.** Humidity and temperature profile in the nasal cavity. *Rhinology* 38, 167-171.
126. **Kelly, A., Lyons, G., Gambki, B., Rubinstein, N., 1985.** Influences of testosterone on contractile proteins of the guinea pig temporalis muscle. *Adv. Exp. Med. Biol.* 182, 155-168.
127. **Kelly, F.J., Goldspink, D.F., 1982.** The differing responses of four muscle types to dexamethasone treatment in the rat. *Biochem. J.* 208, 147-151.
128. **Kelly, G.S., 2000.** Peripheral metabolism of thyroid hormones: a review. *Altern. Med. Rev.* 5, 306-333.
129. **Kernell, D., Hensbergen, E., Lind, A., Eerbeek, O., 1998.** Relation between fibre composition and daily duration of spontaneous activity in ankle muscles of the cat. *Arch. Ital. Biol.* 136, 191-203.
130. **Kimmelman, C.P., 1993.** Clinical review of olfaction. *Am. J. Otolaryngol.* 14, 227-239.
131. **Knudsen, J.H., Court-Payen, M., Kjaersgaard, E., Christensen, N.J., 1995.** Lymphocyte subset composition in peripheral blood from normal subjects may be influenced by both spleen size and plasma norepinephrine. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 55, 643-648.
132. **Knuth, E.D., Etgen, A.M., 2005.** Corticosterone secretion induced by chronic isolation in neonatal rats is sexually dimorphic and accompanied by elevated ACTH. *Horm. Behav.* 47, 65-75.
133. **Kofler, R., 2000.** The molecular basis of glucocorticoid-induced apoptosis of lymphoblastic leukemia cells. *Histochem. Cell. Biol.* 114, 1-7.
134. **Kohrle, J., 1996.** Thyroid hormone deiodinases--a selenoenzyme family acting as gate keepers to thyroid hormone action. *Acta Med. Austriaca.* 23, 17-30.
135. **Koibuchi, N., Chin, W.W., 2000.** Thyroid hormone action and brain development. *Trends Endocrinol. Metab.* 11, 123-128.

- 136. Koibuchi, N., Iwasaki, T., 2006.** Regulation of brain development by thyroid hormone and its modulation by environmental chemicals. *Endocr. J.* 53, 295-303.
- 137. Korfage, J.A., Koolstra, J.H., Langenbach, G.E., van Eijden, T.M., 2005.** Fiber-type composition of the human jaw muscles--(part 1) origin and functional significance of fiber-type diversity. *J. Dent. Res.* 84, 774-783.
- 138. Kristensen, H.H., Jones, R.B., Schofield, C.P., White, R.P., Wathes, C.M., 2001.** The use of olfactory and other cues for social recognition by juvenile pigs. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 72, 321-333.
- 139. Kucharski, D., Hall, W.G., 1987.** New routes to early memories. *Science* 238, 786-788.
- 140. Lalonde, R., 2002.** The neurobiological basis of spontaneous alternation. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 26, 91-104.
- 141. Lassalle, J.M., 2004.** L'éthologie cognitive. Sous la direction de Jacques Vauclair et Michel Kreutzer. *Edition Ophrys. Fondation de la maison des sciences de l'homme.* p. 49-50.
- 142. Lazarus, R. S., Folkman, S., 1984.** Stress, appraisal, and coping. *New York: Springer Publishing Company, Inc.*
- 143. Lecker, S.H., Jagoe, R.T., Gilbert, A., Gomes, M., Baracos, V., Bailey, J., Price, S.R., Mitch, W.E., Goldberg, A.L., 2004.** Multiple types of skeletal muscle atrophy involve a common program of changes in gene expression. *FASEB J.* 18, 39-51.
- 144. Lee, M.H., Williams, D.I., 1977.** Longitudinal study of mother - young interaction in the rat : the effect of infantil stimulation, diurnal rythms and pup maturation. *Behaviour* 63, 241-261.
- 145. Leon, M., Moltz, H., 1971.** Maternal pheromone: discrimination by pre-weanling albino rats. *Physiol. Behav.* 7, 265-267.
- 146. Leone, R.J. Jr, Krasna, I.H., 2000.** 'Spontaneous' neonatal gastric perforation: is it really spontaneous? *J. Pediatr. Surg.* 35, 1066-1069.
- 147. Lewis, M.I., Sieck, G.C., 1992.** Effect of acute nutritional deprivation on diaphragm structure and function in adolescent rats. *J. Appl. Physiol.* 73, 974-978.

- 148. Losken, A., Mooney, M.P., Siegel, M.I., 1994.** Comparative cephalometric study of nasal cavity growth patterns in seven animal models. *Cleft Palate Craniofac. J.* 31, 17-23.
- 149. Lyons, G.E., Kelly, A.M., Rubinstein, N.A., 1986.** Testosterone-induced changes in contractile protein isoforms in the sexually dimorphic temporalis muscle of the guinea pig. *J. Biol. Chem.* 261, 13278-13284.
- 150. Ma, M., Grosmaître, X., Iwema, C.L., Baker, H., Greer, C.A., Shepherd, G.M., 2003.** Olfactory signal transduction in the mouse septal organ. *J. Neurosci.* 23, 317-324.
- 151. Mann, P.S., 1993.** Measurement of maternal behaviour. *Methods Neurosci.* 14, 343 - 357.
- 152. Maxwell, L.C., Carlson, D.S., McNamara, J.A. Jr, Faulkner, J.A., 1979.** Histochemical characteristics of the masseter and temporalis muscles of the rhesus monkey (*Macaca mulatta*). *Anat. Rec.* 193, 389-402.
- 153. Meisami, E., 1976.** Effects of olfactory deprivation on postnatal growth of the rat olfactory bulb utilizing a new method for production of neonatal unilateral anosmia. *Brain Res.* 107, 437-444.
- 154. Meisami, E., Safari, L., 1981.** A quantitative study of the effects of early unilateral olfactory deprivation on the number and distribution of mitral and tufted cells and of glomeruli in the rat olfactory bulb. *Brain Res.* 221, 81-107.
- 155. Miller, M.J., Martin, R.J., Carlo, W.A., Fouke, J.M., Strohl, K.P., Fanaroff, A.A., 1985.** Oral breathing in newborn infants. *J. Pediatr.* 107, 465-469.
- 156. Mirich, J.M., Brunjes, P.C., 2001.** Activity modulates neuronal proliferation in the developing olfactory epithelium. *Brain Res. Dev. Brain Res.* 127, 77-80.
- 157. Moe, R.O., Bakken, M., 1997.** Effects of handling and physical restraint on rectal temperature, cortisol, glucose and leucocyte counts in the silver fox (*Vulpes vulpes*). *Acta. Vet. Scand.* 38, 29-39.
- 158. Moore, C.L., Morelli, G.A., 1979.** Mother rats interact differently with male and female offspring. *J. Comp. Physiol. Psychol.* 93, 677-684.

- 159. Morimoto, M., Morita, N., Ozawa, H., Yokoyama, K., Kawata, M., 1996.** Distribution of glucocorticoid receptor immunoreactivity and mRNA in the rat brain: an immunohistochemical and in situ hybridization study. *Neurosci. Res.* 26, 235-269.
- 160. Morrow-Tesch, J.L., McGlone, J.J., Norman, R.L., 1993.** Consequences of restraint stress on natural killer cell activity, behavior, and hormone levels in rhesus macaques (*Macaca mulatta*). *Psychoneuroendocrinology* 18, 383-395.
- 161. Mortola, J.P., Fisher, J.T., 1981.** Mouth and nose resistance in newborn kittens and puppies. *J. Appl. Physiol.* 51, 641-645.
- 162. Morton, A.R., King, K., Papalia, S., Goodman, C., Turley, K.R., Wilmore, J.H., 1995.** Comparison of maximal oxygen consumption with oral and nasal breathing. *Aust. J. Sci. Med. Sport* 27, 51-55.
- 163. Morton, G.J., Gelling, R.W., Niswender, K.D., Morrison, C.D., Rhodes, C.J., Schwartz, M.W., 2005.** Leptin regulates insulin sensitivity via phosphatidylinositol-3-OH kinase signaling in mediobasal hypothalamic neurons. *Cell. Metab.* 2, 411-420.
- 164. Moss, M.L., 1969.** The primary role of functional matrices in facial growth. *Am. J. Orthod.* 55, 566-577.
- 165. Munck, A., Guyre, P. M., Holbrook, N. J., 1984.** Physiological functions of glucocorticoids in stress and their relation to pharmacological actions. *Endocr. Rev.* 5, 25-44.
- 166. Munck, A., Guyre, P.M., 1986.** Glucocorticoid physiology, pharmacology and stress. *Adv. Exp. Med. Biol.* 196, 81-96.
- 167. Mussa, G.C., Mussa, F., Bretto, R., Zambelli, M.C., Silvestro, L., 2001.** Influence of thyroid in nervous system growth. *Minerva Pediatr.* 53, 325-353.
- 168. Naito, H., Inoue, M., Makino, J., 2000.** Ultrasonic isolation calls in genetically high- and low-emotional rat pups. *Exp. Anim.* 49, 289-294.
- 169. Najbauer, J., Leon, M., 1995.** Olfactory experience modulated apoptosis in the developing olfactory bulb. *Brain Res.* 674, 245-251.
- 170. Nakajima, K., Ohi, G., 1977.** Aerophagia induced by the nasal obstruction on experimental animals. *Jikken Dobutsu.* 26, 149-159.

- 171. Nelson, A.G., Thompson, W.J., 1994.** Contractile properties and myosin phenotype of single motor units from neonatal rats. *Am. J. Physiol.* 266, 919-924.
- 172. Nordeen, E.J., Nordeen, K.W., Sengelaub, D.R., Arnold, A.P., 1985.** Androgens prevent normally occurring cell death in a sexually dimorphic spinal nucleus. *Science* 229, 671-673.
- 173. Nowak, R., Levy, F., Orgeur, P., Porter, R.H., Schaal, B., 2000.** Mother - young interactions in mammals and their role in the survival of the offspring. *Reviews on Reproduction* 5, 153-163.
- 174. Nyberg, L., 2005.** Any novelty in hippocampal formation and memory? *Curr. Opin. Neurol.* 18, 424-428.
- 175. Oberkotter, L.V., 1988.** Suckling, but not formula feeding, induces a transient hyperthyroxinemia in rat pups. *Endocrinology* 123, 127-133.
- 176. Ono, T., Ishiwata, Y., Kuroda, T., 1998.** Inhibition of masseteric electromyographic activity during oral respiration. *Am. J. Orthod. Dentofacial. Orthop.* 113, 518-525.
- 177. Oppenheimer, J.H., Schwartz, H.L., 1997.** Molecular basis of thyroid hormone-dependent brain development. *Endocr. Rev.* 18, 462-475.
- 178. Ottaviani, E., Franceschi, C., 1996.** The neuroimmunology of stress from invertebrates to man. *Prog. Neurobiol.* 48, 421-440.
- 179. Pacak, K., Palkovits, M., 2001.** Stressor specificity of central neuroendocrine responses: implications for stress-related disorders. *Endocr. Rev.* 22, 502-548.
- 180. Palmer, G., Aurrand-Lions, M., Contassot, E., Talabot-Ayer, D., Ducrest-Gay, D., Vesin, C., Chobaz-Peclat, V., Busso, N., Gabay, C., 2006.** Indirect effects of leptin receptor deficiency on lymphocyte populations and immune response in db/db mice. *J. Immunol.* 177, 2899-2907.
- 181. Papathanassoglou, E., El-Haschimi, K., Li, X.C., Matarese, G., Strom, T., Mantzoros, C., 2006.** Leptin receptor expression and signaling in lymphocytes: kinetics during lymphocyte activation, role in lymphocyte survival, and response to high fat diet in mice. *J. Immunol.* 176, 7745-7752.

- 182. Paternostro, M.A., Meisami, E., 1991.** Lack of thyroid hormones but not their excess affects the maturation of olfactory receptor neurons: a quantitative morphologic study in the postnatal rat. *Int. J. Dev. Neurosci.* 9, 439-452.
- 183. Pazirandeh, A., Xue, Y., Prestegaard, T., Jondal, M., Okret, S., 2002.** Effects of altered glucocorticoid sensitivity in the T cell lineage on thymocyte and T cell homeostasis. *FASEB J.* 16, 727-729.
- 184. Peretto, P., Giachino, C., Panzica, G.C., Fasolo, A., 2001.** Sexually dimorphic neurogenesis is topographically matched with the anterior accessory olfactory bulb of the adult rat. *Cell. Tissue Res.* 306, 385-389.
- 185. Pette, D., Staron, R.S., 2000.** Myosin isoforms, muscle fiber types, and transitions. *Microsc. Res. Tech.* 50, 500-509.
- 186. Phifer, C.B., Terry, L.M., 1986.** Use of hypothermia for general anesthesia in preweanling rodents. *Physiol. Behav.* 38, 887-890.
- 187. Philpot, B.D., Men, D., McCarty, R., Brunjes, P.C., 1998.** Activity-dependent regulation of dopamine content in the olfactory bulbs of naris-occluded rats. *Neuroscience* 85, 969-977.
- 188. Pohunek, P., 2004.** Development, structure and function of the upper airways. *Paediatr. Respir.* 5, 2-8.
- 189. Polan, H.J., Hofer, M.A., 1998.** Olfactory preference for mother over home nest shavings by newborn rats. *Dev. Psychobiol.* 33, 5-20.
- 190. Polla, B., D'Antona, G., Bottinelli, R., Reggiani, C., 2004.** Respiratory muscle fibres: specialisation and plasticity. *Thorax* 59, 808-817.
- 191. Poucet, B., Save, E., 2004.** L'éthologie cognitive. Sous la direction de Jacques Vauclair et Michel Kreutzer. *Edition Ophrys. Fondation de la maison des sciences de l'homme.* p. 106-107.
- 192. Poucet, B., Benhamou, S., 1997.** The neuropsychology of spatial cognition in the rat. *Crit. Rev. Neurobiol.* 11, 101-120.
- 193. Poucet, B., Chapuis, N., Durup, M., Thinus-Blanc, C., 1986.** A study of exploratory behavior as an index of spatial knowledge in hamsters. *Animal Learning and Behavior* 14, 93-100.

194. Raff, H., 2002. Effect of hypoxia on parathyroid hormone in lactating and neonatal rats: interaction with halothane. *Endocrine* 17, 157-160.
195. Qin, L., Appell, H.J., Chan, K.M., Maffulli, N., 1997. Electrical stimulation prevents immobilization atrophy in skeletal muscle of rabbits. *Arch. Phys. Med. Rehabil.* 78, 512-517.
196. Rajan, R., Clement, J.P., Bhalla, U.S., 2006. Rats smell in stereo. *Science* 311, 666-670.
197. Raji, A., Mahtar, M., Essaadim, M., Kadiri, F., Detsouli, M., Chekkoury, I.A., Benchekrouny, Y., 2001. Conduite à tenir devant une obstruction nasale chez l'enfant : aspects diagnostiques et approche thérapeutique. *Médecine du Maghreb* 90, 23-27.
198. Ramadan, M.F., 1983. Experimental nasal obstruction and changes in the arterial blood gases. *Clin. Otolaryngol. Allied Sci.* 8, 245-50.
199. Ricceri, L., Colozza, C., Calamandrei, G., 2000. Ontogeny of spatial discrimination in mice: a longitudinal analysis in the modified open-field with objects. *Dev. Psychobiol.* 37, 109-118.
200. Risser, J.M., Slotnick, B.M., 1987. Nipple attachment and survival in neonatal olfactory bulbectomized rats. *Physiol. Behav.* 40, 545-549.
201. Rivas, M., Naranjo, J.R., 2007. Thyroid hormones, learning and memory. *Genes Brain Behav.* 1, 40-44.
202. Rosenblatt, J.S., Lehrman, D.S., 1963. Maternal behavior in the laboratory rat. In: Rheingold, H.L., Editor, 1963. *Maternal Behavior in Mammals*, Wiley, New York, USA, pp. 8-57.
203. Roy, R.R., Baldwin, K.M., Edgerton, V.R., 1991. The plasticity of skeletal muscle, effects of neuromuscular activity. *Exercise and Sports Sciences Reviews*, edited by Holloszy, J., Baltimore: Williams and Wilkins, pp. 269-312.
204. Sant'Ana Pereira, J.A., Sargeant, A.J., Rademaker, A.C., de Haan, A., van Mechelen, W., 1996. Myosin heavy chain isoform expression and high energy phosphate content in human muscle fibres at rest and post-exercise. *J. Physiol.* 496, 583-588.

- 205. Sapolsky, R.M., Krey, L.C., McEwen, B.S., 1983.** Corticosterone receptors decline in a site-specific manner in the aged rat brain. *Brain Res.* 289, 235-240.
- 206. Sapolsky, R.M., Meaney, M.J., 1986.** Maturation of the adrenocortical stress response: neuroendocrine control mechanisms and the stress hyporesponsive period. *Brain Res.* 396, 64-76.
- 207. Scarano, E., Fetoni, A.R., Picciotti, P., Cadoni, G., Galli, J., Paludetti, G., 2003.** Can chronic nasal obstruction cause dysfunction of the paratubal muscles and otitis media? An experimental study in developing Wistar rats. *Acta. Otolaryngol.* 123, 288-291.
- 208. Schaal, B., Orgeur, P., 1992.** Olfaction in utero: can the rodent model be generalized? *Q. J. Exp. Psychol. B.* 44, 245-278.
- 209. Schapiro, S., Percin, C.J., Kotichas, F.J., 1971.** Half-life of plasma corticosterone during development. *Endocrinology* 89, 284-286.
- 210. Schiaffino, S., Gorza, L., Sartore, S., Saggin, L., Ausoni, S., Vianello, M., Gundersen, K., Lomo, T., 1989.** Three myosin heavy chain isoforms in type 2 skeletal muscle fibres. *J. Muscle Res. Cell. Motil.* 10, 197-205.
- 211. Schlenker, W.L., Jennings, B.D., Jeiroudi, M.T., Caruso, J.M., 2000.** The effects of chronic absence of active nasal respiration on the growth of the skull: a pilot study. *Am. J. Orthod. Dentofacial. Orthop.* 117, 706-713.
- 212. Schmidt, M., Okimoto, D.K., Dent, G.W., Gordon, M.K., Levine, S., 2002.** Maternal regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in the 20-day-old rat: consequences of laboratory weaning. *J. Neuroendocrinol.* 14, 450-457.
- 213. Sczerzenie, V., Hsiao, S., 1977.** Development of locomotion toward home nesting material in neonatal rats. *Dev. Psychobiol.* 10, 315-321.
- 214. Seene, T., Kaasik, P., Pehme, A., Alev, K., Riso, E.M., 2003.** The effect of glucocorticoids on the myosin heavy chain isoforms' turnover in skeletal muscle. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 86, 201-206.
- 215. Seene, T., Viru, A., 1982.** The catabolic effect of glucocorticoids on different types of skeletal muscle fibres and its dependence upon muscle activity and interaction with anabolic steroids. *J. Steroid. Biochem.* 16, 349-352.\*

216. **Seiden, A.M., Duncan, H.J., 2001.** The diagnosis of a conductive olfactory loss. *Laryngoscope* 111, 9-14.
217. **Selye, H., 1950.** Stress and the general adaptation syndrome. *Br. Med. J.* 1, 1383-1392.
218. **Shaker, I.J., Schaefer, J.A., James, A.E. Jr, White, J.J., 1973.** Aerophagia, a mechanism for spontaneous rupture of the stomach in the newborn. *Am. Surg.* 39, 619-623.
219. **Shanks, N., Lightman, S.L., 2001.** The maternal-neonatal neuro-immune interface: are there long-term implications for inflammatory or stress-related disease? *J. Clin. Invest.* 108, 1567-1573.
220. **Shanks, N., Windle, R.J., Perks, P.A., Harbuz, M.S., Jessop, D.S., Ingram, C.D., Lightman, S.L., 2000.** Early-life exposure to endotoxin alters hypothalamic-pituitary-adrenal function and predisposition to inflammation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 97, 5645-5650.
221. **Shi, Y.X., Seto-Poon, M., Wheatley, J.R., 1998.** Breathing route dependence of upper airway muscle activity during hyperpnea. *J. Appl. Physiol.* 84, 1701-1706.
222. **Shikata, N., Ueda, H.M., Kato, M., Tabe, H., Nagaoka, K., Nakashima, Y., Matsumoto, E., Tanne, K., 2004.** Association between nasal respiratory obstruction and vertical mandibular position. *J. Oral. Rehabil.* 31, 957-962.
223. **Shurin, M.R., Zhou, D., Kusnecov, A., Rassnick, S., Rabin, B.S., 1994.** Effect of one or more footshocks on spleen and blood lymphocyte proliferation in rats. *Brain Behav. Immun.* 8, 57-65.
224. **Sieck, G.C., Fournier, M., Prakash, Y.S., Blanco, C.E., 1996.** Myosin phenotype and SDH enzyme variability among motor unit fibers. *J. Appl. Physiol.* 80, 2179-2189.
225. **Sieck, G.C., Regnier, M., 2001.** Plasticity and energetic demands of contraction in skeletal and cardiac muscle. *J Appl Physiol.* 90, 1158-1164.
226. **Silva, J.E., 2003.** The thermogenic effect of thyroid hormone and its clinical implications. *Ann. Intern. Med.* 139, 205-213.
227. **Silva, J.E., Larsen, P.R., 1983.** Adrenergic activation of triiodothyronine production in brown adipose tissue. *Nature* 305, 712-713.

- 228. Singh, P.J., Tobach, E., 1975.** Olfactory bulbectomy and nursing behavior in rat pups (Wistar DAB). *Dev. Psychobiol.* 8, 151-164.
- 229. Slotnick, B.M., Pazos, A.J., 1990.** Rats with one olfactory bulb removed and the contralateral naris closed can detect odors. *Physiol. Behav.* 48, 37-40.
- 230. Song, C., Leonard, B.E., 2005.** The olfactory bulbectomised rat as a model of depression. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 29, 627-647.
- 231. Song, C., Leonard, B.E., 1994.** The effects of chronic lithium chloride administration on some behavioral and immunological changes in the bilaterally olfactory bulbectomized rat. *J. Psychopharmacol.* 8, 440-447.
- 232. Song, H.G., Pae, E.K., 2001.** Changes in oro-facial muscle activity in response to changes in respiratory resistance. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 119, 436-442.
- 233. Soppi, E., 1981.** The role of the maturation stage of thymocytes on the phytohemagglutinin and concanavalin A responses in thymocyte and lymph node lymphocyte cocultures in guinea pig. Effects of pre-treatment of thymocytes with thymosin or levamisole. *Immunopharmacology* 3, 83-91.
- 234. Soucek, G., Breit, S., Konig, H.E., Liebich, H.G., 1999.** Functional significance of musculature of the external nose in swine (*Sus scrofa f. domestica*). *Anat. Histol. Embryol.* 28, 307-314.
- 235. Spyropoulos, M.N., Tsolakis, A.I., Alexandridis, C., Katsavrias, E., Dontas, I., 2002.** Role of suprahyoid musculature on mandibular morphology and growth orientation in rats. *Am. J. Orthod. Dentofacial. Orthop.* 122, 392-400.
- 236. Stahl, B., Distel, H., Hudson, R., 1990.** Effects of reversible nare occlusion on the development of the olfactory epithelium in the rabbit nasal septum. *Cell. Tissue Res.* 259, 275-281.
- 237. Stefanski, V., Engler, H., 1999.** Social stress, dominance and blood cellular immunity. *J. Neuroimmunol.* 94, 144-152.
- 238. Stefanski, V., Solomon, G.F., Kling, A.S., Thomas, J., Plaeger, S., 1996.** Impact of social confrontation on rat CD4 T cells bearing different CD45R isoforms. *Brain Behav. Immun.* 10, 364-379.

- 239. Stern, J.M., Johnson, S.K., 1990.** Ventral somatosensory determinants of nursing behavior in Norway rats. I. Effects of variations in the quality and quantity of pup stimuli. *Physiol. Behav.* 47, 993-1011.
- 240. Sullivan, R.M., 2003.** Developing a sense of safety: the neurobiology of neonatal attachment. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1008, 122-131.
- 241. Svensson, S., Olin, A.C., Hellgren, J., 2006.** Increased net water loss by oral compared to nasal expiration in healthy subjects. *Rhinology* 44, 74-77.
- 242. Tacx, A.N., Strack Van Schijndel, R.J., 2003.** Arterial hypoxemia due to packing of the nose. *Ned. Tijdschr. Geneesk.* 147, 1747-1749.
- 243. Talmadge, R.J., Roy, R.R., 1993.** Electrophoretic separation of skeletal muscle myosin heavy chain. *J. Appl. Physiol.* 75, 2337-2340.
- 244. Tangel, D.J., Mezzanotte, W.S., White, D.P., 1995.** Respiratory-related control of palatoglossus and levator palatini muscle activity. *J. Appl. Physiol.* 78, 680-688.
- 245. Tarcic, N., Ovadia, H., Weiss, D.W., Weidenfeld, J., 1998.** Restraint stress-induced thymic involution and cell apoptosis are dependent on endogenous glucocorticoids. *J. Neuroimmunol.* 82, 40-46.
- 246. Teicher, M.H., Shaywitz, B.A., Lumia, A.R., 1984.** Olfactory and vomeronasal system mediation of maternal recognition in the developing rat. *Brain Res.* 314, 97-110.
- 247. Terry, L.M., Johanson, I.B., 1996.** Effects of altered olfactory experiences on the development of infant rats' responses to odors. *Dev. Psychobiol.* 29, 353-377.
- 248. Teunis, M. A., Heijnen, C. J., Sluyter, F., Bakker, J. M., Van Dam, A. M., Hof, M., Cools, A. R., Kavelaars, A., 2002.** Maternal deprivation of rat pups increases clinical symptoms of experimental autoimmune encephalomyelitis at adult age. *J. Neuroimmunol.* 133, 30-38.
- 249. Thinus-Blanc, C., Bouzouba, L., Chaix, C., Chapuis, N., Durup, M., Poucet, B., 1987.** A study of spatial parameters encoded during exploration in hamsters. *J. Exp. Psychol. Animal Behavior Processes* 13, 418-427.

- 250. Toft, P., Svendsen, P., Tonnesen, E., Rasmussen, J.W., Christensen, N.J., 1993.** Redistribution of lymphocytes after major surgical stress. *Acta. Anaesthesiol. Scand.* 37, 245-249.
- 251. Usami, A., Abe, S., Ide, Y., 2003.** Myosin heavy chain isoforms of the murine masseter muscle during pre- and post-natal development. *Anat. Histol. Embryol.* 32, 244-248.
- 252. Van Den Hove, D.L., Steinbusch, H.W., Scheepens, A., Van De Berg, W.D., Kooiman, L.A., Boosten, B.J., Prickaerts, J., Blanco, C.E., 2006.** Prenatal stress and neonatal rat brain development. *Neuroscience* 137, 145-155.
- 253. Van Oers, H.J., de Kloet, E.R., Levine, S., 1999.** Persistent effects of maternal deprivation on HPA regulation can be reversed by feeding and stroking, but not by dexamethasone. *J. Neuroendocrinol.* 11, 581-588.
- 254. Van Raaij, M.T., Oortgiesen, M., Timmerman, H.H., Dobbe, C.J., Van Loveren, H., 1996.** Time-dependent differential changes of immune function in rats exposed to chronic intermittent noise. *Physiol. Behav.* 60, 1527-1533.
- 255. Van Wessel, T., Langenbach, E.J., Van Ruijven, L.J., Brugman, P., Van Eijden, T.M., 2005.** Daily number and lengths of activity bursts in rabbit jaw muscles. *Eur. J. Neurosc.* 21, 2209-2216.
- 256. Vazquez, D.M., 1998.** Stress and the developing limbic-hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Psychoneuroendocrinology* 23, 663-700.
- 257. Vazquez, D.M., Van Oers, H., Levine, S., Akil, H., 1996.** Regulation of glucocorticoid and mineralocorticoid receptor mRNAs in the hippocampus of the maternally deprived infant rat. *Brain Res.* 731, 79-90.
- 258. Vig, K.W., 1998.** Nasal obstruction and facial growth: the strength of evidence for clinical assumptions. *Am. J. Orthod. Dentofacial Orthop.* 113, 603-611.
- 259. Villa-Verde, D.M., de Mello-Coelho, V., Farias-de-Oliveira, D.A., Dardenne, M., Savino, W., 1993.** Pleiotropic influence of triiodothyronine on thymus physiology. *Endocrinology* 133, 867-875.
- 260. Visser, T.J., 1996.** Pathways of thyroid hormone metabolism. *Acta. Med. Austriaca.* 23, 10-16.

- 261. Walker, C.D., Deschamps, S., Proulx, K., Tu, M., Salzman, C., Woodside, B., Lupien, S., Gallo-Payet, N., Richard, D., 2004.** Mother to infant or infant to mother? Reciprocal regulation of responsiveness to stress in rodents and the implications for humans. *J. Psychiatry Neurosci.* 29, 364-382.
- 262. Weiler, E., Farbman, A.I., 1997.** Proliferation in the rat olfactory epithelium: age-dependent changes. *J. Neurosci.* 17, 3610-3622.
- 263. Whalen, R.G., Sell, S.M., Butler-Browne, G.S., Schwartz, K., Bouveret, P., Pinset-Harstom, I., 1981.** Three myosin heavy-chain isozymes appear sequentially in rat muscle development. *Nature* 292, 805-809.
- 264. White, P., Cattaneo, D., Dauncey, M.J., 2000.** Postnatal regulation of myosin heavy chain isoform expression and metabolic enzyme activity by nutrition. *Br. J. Nutr.* 84, 185-194.
- 265. Will, B., Toniolo, G., Kelche, C., Pallage, V., Deluzarche, F., Misslin, R., 1986.** The effects of postoperative physical environment on novelty seeking behaviour and maze learning in rats with hippocampal lesions. *Behav. Brain Res.* 19, 233-240.
- 266. Williams, J.S., Janssen, P.L., Fuller, D.D., Fregosi, R.F., 2000.** Influence of posture and breathing route on neural drive to upper airway dilator muscles during exercise. *J. Appl. Physiol.* 89, 590-598.
- 267. Wills, T.A., Vaccaro, D., McNamara, G., 1994.** Novelty seeking, risk taking and related constructs as predictors of adolescent substance use: an application of Cloninger's theory. *J. Subst. Abuse* 6, 1-20.
- 268. Windisch, A., Gundersen, K., Szabolcs, M.J., Gruber, H., Lomo, T., 1998.** Fast to slow transformation of denervated and electrically stimulated rat muscle. *J Physiol.* 510, 623-632.
- 269. Wingfield, J. C., Ramenofsky., M., 1999.** Hormones and the behavioral ecology of stress. *P.H.M. Balm (ed.), Stress physiology in animals, pp. 1-51. Sheffield Academic Press, Sheffield, U.K.*
- 270. Wu, H.H., Ivkovic, S., Murray, R.C., Jaramillo, S., Lyons, K.M., Johnson, J.E., Calof, A.L., 2003.** Autoregulation of neurogenesis by GDF11. *Neuron.* 37, 197-207.

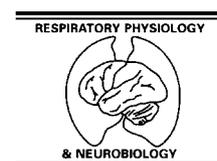
- 271. Xie, Y., Frede, S., Harnish, M.J., Exton, M.S., Schedlowski, M., 2002.** Beta-adrenoceptor-induced inhibition of rat splenocyte proliferation: cytokine gene transcription as the target of action. *Immunobiology* 206, 345-353.
- 272. Yoshimura, S., Sakamoto, S., Kudo, H., Sassa, S., Kumai, A., Okamoto, R., 2003.** Sex-differences in adrenocortical responsiveness during development in rats. *Steroids* 68, 439-445.
- 273. Zayour, D., Azar, S.T., Azar, N., Nasser, M., Obeid, M., Mroueh, S., Dbaiibo, G.S., Bitar, F.F., 2003.** Endocrine changes in a rat model of chronic hypoxia mimicking cyanotic heart disease. *Endocr. Res.* 29, 191-200.
- 274. Zhan, W.Z., Watchko, J.F., Prakash, Y.S., Sieck, G.C., 1998.** Isotonic contractile and fatigue properties of developing rat diaphragm muscle. *J. Appl. Physiol.* 84, 1260-1268.

## Annexes



## Annexe 1





## Myosin heavy chain expression and muscle adaptation to chronic oral breathing in rat

M. Gelhaye<sup>a</sup>, J.M. Martrette<sup>a,b,\*</sup>, C. Legrand-Frossi<sup>a</sup>, M. Trabalon<sup>a</sup>

<sup>a</sup> *Physiologie du Comportement, Faculté des Sciences et Techniques, CEPE, UPR-CNRS 9010, BP 239, 54506 Vandœuvre-lès-Nancy Cedex, France*

<sup>b</sup> *Département des Sciences Biologiques, Faculté d'Odontologie, BP 3034, 54012 Nancy Cedex, France*

Accepted 21 December 2005

### Abstract

The purpose of this study was to establish if early chronic oral breathing could induce an ultra-structural adaptation of the diaphragm and orofacial muscles related to oral or nasal breathing. Therefore, we performed a bilateral nasal obstruction at day 8 on rat pups and the myosin heavy chain (MHC) composition of the muscles was analyzed at day 21. Nasal obstruction and the related switch to chronic oral breathing were associated with impaired growth, atrophy of olfactory bulbs, hypertrophy of adrenal glands and reduced muscle growth for all muscles studied except the diaphragm. Furthermore, we detected a smaller decrease of MHC 2b compared to MHC 2a and 2x in levator nasolabialis, a muscle involved with nasal breathing. In masseter superficialis and anterior digastric involved with oral breathing, we observed a smaller decrease of MHC 2a compared to MHC 2b or 2x, respectively. No difference was detected in the diaphragm MHC expression of oral breathing animals. Since the relative expression of fatigue resistant MHC fiber types increased in muscles involved with oral breathing, orofacial muscles seem to present a profile in MHC adapted to the transition from nasal to oral breathing, facilitating respiration.

© 2006 Elsevier B.V. All rights reserved.

**Keywords:** Nasal obstruction; Oral breathing; Myosin heavy chains; Skeletal muscle; Post-natal development; Stress

### 1. Introduction

Evidence is now available showing that muscle contractile properties and myosin heavy chain (MHC) composition are correlated (Bottinelli et al., 1996). The four major myosin heavy chain isoforms detectable in adult skeletal muscles are three fast types, MHC 2a,

2x and 2b, and one slow type, MHC 1 (Bär and Pette, 1988). During development, two perinatal types can be found in muscle fibers depending on the stage considered: MHC embryonic and neonatal. These different MHC appear sequentially in fast and slow muscles and the developmental program of myosin expression greatly depends on the type of muscle (D'Albis et al., 1989). Thus, at birth, rat muscles are phenotypically immature and during development, or when the working conditions are changed, marked transitions in the myosin content occur in rat fast- and slow-twitch

\* Corresponding author. Tel.: +33 383 68 42 64.

E-mail address: [jean-marc.martrette@odonto.uhp-nancy.fr](mailto:jean-marc.martrette@odonto.uhp-nancy.fr) (J.M. Martrette).

muscles (Swynghedauw, 1986). These modifications generally adapt the muscle to the new environmental requirements.

Chronic nasal obstruction is a non-specific condition observed in many pathological conditions. Nevertheless, because this disorder is not life threatening (at least in adults), its importance is frequently underestimated. Impaired nasal breathing results in obligatory oral breathing, which can be divided into two components: chronic absence of active nasal respiration that results in an olfactory deprivation (Meisami, 1976) and chronic mouth opening (Schlenker et al., 2000). Furthermore, in contrast to oral breathing, nasal breathing allows the optimal conditioning of inhaled air, clearing, moistening and warming the air before the gas exchange in the lungs (Bettlejewski, 1998; Keck et al., 2001). A lack of conditioning could induce some degree of hypoxia (Tacx and Strack Van Schijndel, 2003).

Possible hyposmia and hypoxia produced by nasal obstruction are multi-factorial conditions. Indeed, in addition to the loss of olfactory input, which could induce a social deprivation, other factors like metabolic and nutritional changes could stimulate the neuro-endocrine response to stress. Thus, nasal obstruction could be associated with both social (via maternal deprivation) and physical (via hypoxia, nutritional deficit, ...) stress. Stressful situations correspond to particular changes in the environmental conditions that induce modifications in different physiological parameters like plasma hormonal levels. For example, stressful situations produce an adrenal hypertrophy and an increase of plasma glucocorticoid levels known to induce alterations in MHC isoforms expression (Polla et al., 1994; Gomez et al., 1996; Basset and West, 1997). In particular, Martrette et al. (2004) have shown that during a controllable painless stress, the administration of dexamethasone, an agonist of the glucocorticoid receptor, induced a marked increase in the relative expression of MHC 2b to the detriment of MHC 2a in anterior digastric and masseter superficialis muscles.

In addition, the contribution of orofacial muscles to the variation in bite force magnitude is correlated with craniofacial morphology (Raadsheer et al., 1999) and chronic oral breathing is known to be a contributing factor to deviant facial growth patterns in pre-school children (Yang et al., 2002; Mattar et al.,

2004). These patterns are the result of a prolonged presence of unbalanced oro-pharyngeal muscle activity. Through mechanoreceptors, oral breathing stimulates oro-pharyngeal electromyographic activity of the muscles facilitating respiration (Song and Pae, 2001). These modifications of electric stimulation may have an effect on MHC isoform expression (Pette and Vrbova, 1999) and the MHC isoform composition of orofacial muscle could be involved in the adaptation to oral breathing during nasal obstruction.

The aim of the present investigation is to evaluate the effect of an early nasal obstruction and the associated switch to chronic oral breathing on orofacial muscles during post-natal development in rats. We suggest that the transition from nasal to oral breathing induces changes in muscle structure that facilitate breathing. To test this hypothesis, we performed a bilateral nasal obstruction and we studied the MHC isoforms composition in different orofacial muscles related to nasal and oral breathing.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Animal care

Twenty-four female Wistar rats (iops IFFA-CREDO) from 8 to 21 days of age were used. These pups were from six litters, which were culled to 10 rats per litter. The rats were kept on a reversed day–night cycle (dark period 08:00–20:00 h). Food and water were available ad libitum during the whole experiment.

### 2.2. Experimental procedure

All experiments conformed to the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals published by the National Institutes of Health (no. 85-23, revised 1996), the recommendations edited by the European Community Council for the Ethical Treatment of Animals (no. 86/609/EEC) and the regulations of the University of Nancy 1 and of the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS, France).

At the age of 8 days, the litters were first anesthetized by hypothermia (10 min at  $-18^{\circ}\text{C}$ ). They were then randomly divided into one control group and one experimental group (oral breathing). A bilat-

eral nasal obstruction resulting in forced oral breathing was performed on experimental animals (three litters,  $n = 11$ ) as described previously by Meisami (1976) and Waguespack et al. (2005). The selected method consisted in the cauterization of the external nostrils, which is the most common and simple procedure allowing the production of nasal obstruction in neonatal animals. The tissue surrounding the external nostrils was burned by placing a surgical cauterizing instrument (1 mm in diameter) on the nostrils, consequently occluding the orifice of the nostrils without mechanical or chemical damage to the olfactory mucosa.

In the control group (three litters,  $n = 13$ ), the nostrils were not sealed but the cauterizing instrument was placed about 1–2 mm above each nostril. After cauterization, the nostrils were washed with chlortetracycline (Aureomycine Evans 3%) to prevent a possible infection. The pups were kept warm (37 °C) for 1 h and they were then returned to the mothers. The animals were subsequently weighed at 9, 12, 15, 18 and 21 days of age and the length was measured from the nose to the base of the tail. To test whether nasal obstruction and the presumed olfactory deprivation that would accompany this procedure affected development of olfactory bulbs, they were removed bilaterally when the animals were 21 days old and were weighed. In addition, to determine whether nasal obstruction and the associated switch to chronic oral breathing was related to hypothalamo-pituitary-adrenal axis activation, adrenal glands were removed bilaterally at 21 days of age and were weighed.

### 2.3. Muscle sampling and myosin extraction

Five rats per group (originating from the three litters) were used for analysis of the muscles. At 21 days of age, the entire diaphragm (Dia, respiratory muscle) was dissected and the following muscles were removed unilaterally (right) from the animals: anterior digastric (AD, depressor mandibular muscle) and masseter superficialis (MS, propulsive mandibular muscle) related to mouth movements and oral breathing (Spyropoulos et al., 2002; Van Wessel et al., 2005) and levator nasolabialis (LN, active sniffing muscle) related to nasal breathing (Hartmann et al., 1999; Soucek et al., 1999). After dissection, muscles were weighed and myosin was isolated in a high ionic strength buffer, as described by D'Albis et al. (1979).

### 2.4. Electrophoretic analysis of myosin heavy chain isoforms

Electrophoresis was performed according to the method of Talmadge and Roy (1993), with few modifications allowing the separation of the developmental MHC as described by Janmot and D'Albis (1994). Mini-gels were used in the Bio-Rad Mini-protean II Dual Slab Cell. Electrophoresis took place in a cold room, at a temperature of 6 °C for the whole run. To separate all the heavy chains, the duration of the run was 28 h (70 V). Three separate loads were made per sample (2.5 µg of protein/well). The MHC isoforms were identified according to migration rates compared with an adult diaphragm containing only adult isoforms 2a, 2x, 2b (about 1%) and 1 (for review, see Pette and Staron, 1990). This diaphragm was dissected and its isoforms of MHC were loaded onto each gel, which is a procedure enabling a correct identification of the different MHC isoforms (Martrette et al., 1998). The gels were stained with Coomassie blue R-250. The relative amounts of the different myosin heavy chains were measured using an integration densitometer Bio-Rad GS-800 and analyzed with the Molecular Analyst Program (Quantity One 4.2.1). Two measurements were performed on each load (i.e. six measurements per sample).

### 2.5. Statistical analysis

The results were expressed as means  $\pm$  S.E. Since all data were normally distributed, Student's *t*-test was used to establish the comparison between control and oral breathing animals. For body weight and body length, group differences were determined using a two-way ANOVA (factor treatment  $\times$  factor age). Specific mean comparisons were then made using *t*-test with Bonferroni correction. Although some data were presented relative to control, all statistical tests were performed on raw data. Differences were considered significant at  $p < 0.05$ .

## 3. Results

### 3.1. Morphometric characteristics

Before the treatment, at 8 days of age, the mass and the length of control and oral breathing pups were

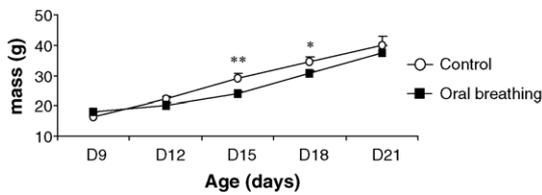


Fig. 1. Effects of chronic oral breathing on body weight at the age from 9 to 21 days. Values are means  $\pm$  S.E. ( $11 < n < 13$ ). Analysis of two-way ANOVA summary: age effect:  $F = 146.40$  at five degrees of freedom,  $p < 0.0001$ ; treatment effect:  $F = 6.99$  at one degree of freedom,  $p < 0.01$ ; age  $\times$  treatment:  $F = 3.77$  at five degrees of freedom,  $p < 0.003$ . Analysis of  $t$ -test with Bonferroni correction: \* significantly different from control group at 18 days at  $p < 0.02$ ; \*\* significantly different from control group at 15 days at  $p < 0.001$ .

not significantly different (respectively,  $p = 0.167$  and  $p = 0.099$ ). Figs. 1 and 2 show the evolution of total growth of animals after the treatment.

Two-way ANOVA detected a significant difference for body mass between control and oral breathing rats (effect age  $\times$  treatment:  $F = 3.77$ ,  $p < 0.003$ ). Between the age of 8 and 21 days, the control animals showed a gain in body mass of 24.6 g versus 20.3 g for oral breathing animals (Fig. 1). Oral breathing animals were significantly smaller than control rats when the animals were 15 and 18 days old (respectively,  $p < 0.001$  and  $p < 0.02$ ). At 9, 12 and 21 days of age, no significant difference was detected between control and oral breathing animals ( $p = 0.15$ – $0.25$ ).

For body length (Fig. 2), two-way ANOVA detected a significant difference between control and

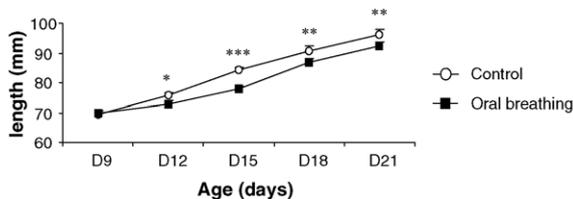


Fig. 2. Effects of chronic oral breathing on body length at the age from 9 to 21 days. Values are means  $\pm$  S.E. ( $11 < n < 13$ ). Analysis of two-way ANOVA summary: age effect:  $F = 266.91$  at five degrees of freedom,  $p < 0.0001$ ; treatment effect:  $F = 18.74$  at one degree of freedom,  $p < 0.0001$ ; age  $\times$  treatment:  $F = 5.52$  at five degrees of freedom,  $p < 0.0001$ . Analysis of  $t$ -test with Bonferroni correction: \* significantly different from control group at 12 days of age at  $p < 0.02$ ; \*\* significantly different from control group at 18 and 21 days at  $p < 0.01$ ; \*\*\* significantly different from control group at 15 days at  $p < 0.0001$ .

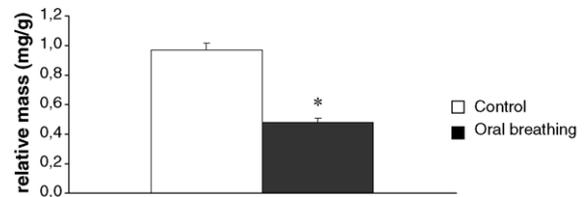


Fig. 3. Effects of chronic oral breathing on relative mass of olfactory bulbs at the age of 21 days. Values are means  $\pm$  S.E. ( $11 < n < 13$ ). \* Significantly different from control group at  $t = -7.24$ ,  $p < 0.0001$ .

oral breathing rats (effect age  $\times$  treatment:  $F = 5.52$ ,  $p < 0.0001$ ). There was no significant difference between control and oral breathing pups at 9 days of age ( $p = 0.70$ ). Nevertheless, oral breathing animals were significantly smaller than control rats at 12 ( $p < 0.02$ ), 15 ( $p < 0.0001$ ), 18 and 21 days of age ( $p < 0.01$ ).

### 3.2. Olfactory bulbs

To check whether nasal obstruction affected the development of olfactory bulbs, their mass was measured at the age of 21 days. Absolute values were significantly different between control and oral breathing animals (respectively,  $41 \pm 2$  mg versus  $14 \pm 1$  mg;  $t = -8.74$ ,  $p < 0.0001$ ). Fig. 3 shows the specific mass of olfactory bulbs in control and oral breathing animals. The means were  $0.97 \pm 0.05$  mg/g body weight in control animals and  $0.48 \pm 0.03$  mg/g body weight in oral breathing animals. A significant reduction (about 50%) of olfactory bulbs weight ( $t = -7.24$ ,  $p < 0.0001$ ) was found in oral breathing group compared to control animals.

### 3.3. Adrenal glands

To determine if the absence of nasal respiration and the related transition to chronic oral breathing were associated with an enhanced level of stress, the mass of adrenal glands was measured at 21 days of age. Absolute values were significantly different between control and oral breathing animals (respectively,  $17 \pm 2$  mg versus  $37 \pm 1$  mg;  $t = -7.05$ ,  $p < 0.0001$ ). These values were related to body weight and Fig. 4 shows a significant increase of adrenal glands weight (more of 200%) in oral breathing animals ( $t = 9.10$ ,  $p < 0.0001$ ). Indeed, the means were  $0.36 \pm 0.03$  mg/g body weight in control animals and  $1.14 \pm 0.09$  mg/g body weight in oral breathing animals.

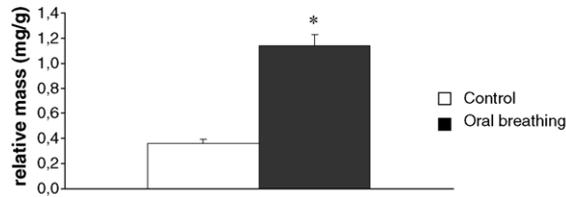


Fig. 4. Effects of chronic oral breathing on relative mass of adrenals glands at the age of 21 days. Values are means  $\pm$  S.E. ( $11 < n < 13$ ). \*Significantly different from control group at  $t = 9.10$ ,  $p < 0.0001$ .

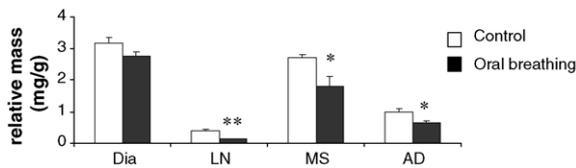


Fig. 5. Effects of chronic oral breathing on relative mass of diaphragm (Dia), levator nasolabialis (LN), masseter superficialis (MS) and anterior digastric (AD) at the age of 21 days. Values are means  $\pm$  S.E. ( $n = 5$ ). \*Significantly different from control MS muscles at  $t = -2.89$ ,  $p = 0.02$  and control AD muscles at  $t = -2.53$ ,  $p = 0.03$ . \*\*Significantly different from control LN muscles at  $t = -5.97$ ,  $p = 0.0003$ .

### 3.4. Muscle mass

The muscles were weighed and related to body weight to determine whether nasal obstruction and mouth opening were associated with a reduced muscle growth during development (Fig. 5). No

significant difference between control and oral breathing animals was detected for the diaphragm ( $t = -1.79$ ;  $p = 0.11$ ). On the other hand, in orofacial muscles, oral breathing was associated with a reduction of muscle growth: 66% in levator nasolabialis ( $0.13 \pm 0.01$  mg/g versus  $0.39 \pm 0.04$  mg/g;  $t = -5.97$ ,  $p = 0.0003$ ), 33% in masseter superficialis ( $1.81 \pm 0.29$  mg/g versus  $2.71 \pm 0.11$  mg/g;  $t = -2.89$ ,  $p = 0.02$ ) and 35% in anterior digastric ( $0.64 \pm 0.07$  mg/g versus  $0.99 \pm 0.12$  mg/g;  $t = -2.53$ ,  $p = 0.03$ ).

### 3.5. MHC isoforms expression

Based on densitometric analysis of the SDS-PAGE, the relative MHC isoform composition of respiratory and orofacial muscles was determined. Electrophoretic bands are presented in Fig. 6 and densitometric analysis results are shown in Fig. 7.

In the adult diaphragm, four MHC isoforms could be detected, the three fast types, MHC 2a, 2x and 2b (only a trace) and the slow type, MHC 1 (Fig. 6). At 21 days of age, only adult MHC isoforms were observed in both control and oral breathing animals. In the diaphragm, MHC 2a, 2x and 1 could be observed. In orofacial muscles (LN, MS and AD), the three adult fast isoforms could be observed. In relative expression, MHC 2x was the most abundant isoform (>40%) in the LN, MS and AD whereas there was no predominant isoform in the diaphragm.

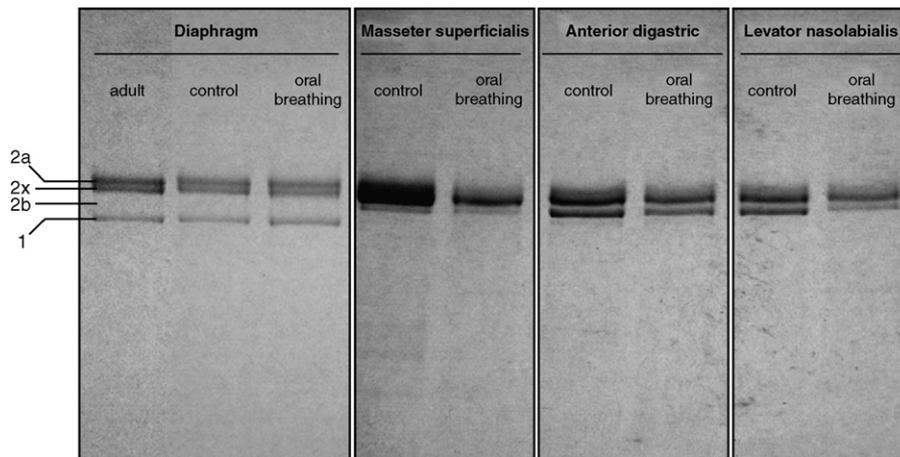


Fig. 6. Effects of chronic oral breathing on myosin heavy chain expression at the age of 21 days in four skeletal muscles. Example of entire gels (four bands identified at the maximum).

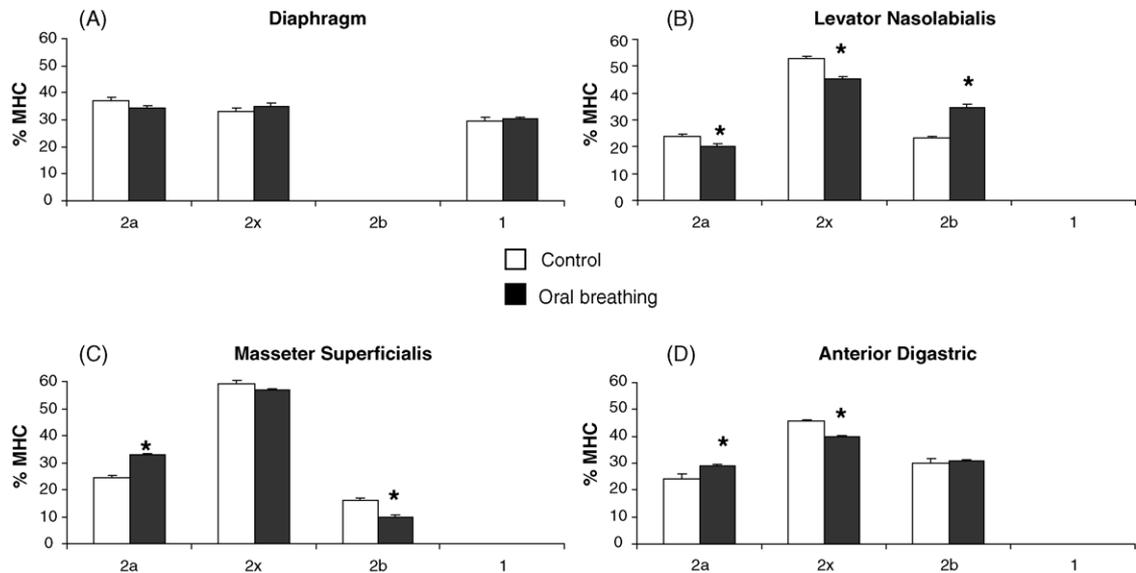


Fig. 7. Myosin heavy chain distribution in diaphragm (A), levator nasolabialis (B), masseter superficialis (C) and anterior digastric (D) at the age of 21 days in control rats and rats exposed to chronic oral breathing. Values are percentages of total MHC  $\pm$  S.E. ( $n=5$ ). \*Significantly different from control muscles at  $t=-11.12$  to  $t=11.63$ ,  $p<0.02$  to  $p<0.0001$ .

In the diaphragm (Fig. 7A), we found no significant difference in the relative distribution of MHC isoforms between control and oral breathing animals. In the LN (Fig. 7B), related to nasal breathing and rearing behavior, oral breathing was associated with a smaller decrease of MHC 2b ( $t=11.63$ ,  $p<0.0001$ ) compared to MHC 2a and 2x (respectively,  $t=-3.53$  and  $t=-7.56$ ,  $p<0.01$  and  $p<0.0001$ ). In the MS (Fig. 7C), related to mouth movements, oral breathing was related to a greater decrease of MHC 2b ( $t=-7.05$ ,  $p<0.0001$ ) compared to MHC 2a ( $t=8.72$ ,  $p<0.0001$ ). In the AD (Fig. 7D), related to mouth opening, oral breathing was associated with a greater decrease of MHC 2x ( $t=-11.12$ ,  $p<0.0001$ ) compared to MHC 2a ( $t=2.84$ ,  $p=0.02$ ).

#### 4. Discussion

The findings of this study are as follow: (1) animals with nasal obstruction presented an impaired olfactory bulb development at 21 days of age. This result confirms the findings of Meisami (1976) who demonstrated that unilateral nasal obstruction produced an atrophy of the ipsilateral olfactory bulb associated with

an olfactory deprivation. Singh and Tobach (1975) have shown that olfactory deprivation induced by bilateral olfactory bulbectomy results in difficulties to find the nipples, which is associated with impaired growth. Therefore, nutritional deprivation could explain the lower body weight of oral breathing animals at 15 and 18 days of age. In addition, the loss of olfactory input could induce a social deprivation (inability to locate the mother and the littermates). This social deprivation could generate alterations of hormonal state of the individuals (Darlene et al., 2002) that could act on growth of animals exposed to nasal obstruction. (2) We demonstrated that nasal obstruction and the associated switch to chronic oral breathing were correlated with an adrenal hypertrophy (>200% compared to controls). It is well known that there is a direct relationship between stress exposure and increased gland weight (Basset and West, 1997). Accordingly, we suggest that nasal obstruction and its consequences (nutritional depletion, hypoxia, olfactory deprivation related to social deprivation) represent a multi-factorial stressful situation, which enhances the global activity of hypothalamo-pituitary-adrenal axis. (3) Finally, we demonstrated that nasal obstruction was associated with a diminution of muscle growth in orofacial muscles and with

some modifications in MHC isoform expression. On the other hand, relative mass and MHC composition of the diaphragm were not significantly altered. In our model of nasal obstruction, different hypothetical factors could act on the muscle development: forcing oral breathing could induce a nutritional deficit, hypoxia, muscle-specific effects of stress hormones and behavioral modifications related to specific changes in electromyographic activity.

The first point concerns the attenuated growth of orofacial muscles, which may result from alterations in nutritional and hormonal state following induction of obligatory oral breathing. Indeed, 6 weeks of nutritional depletion is associated with generalized fiber atrophy in the rat diaphragm (Dekhuijzen et al., 1996). Our analysis of diaphragm did not reveal a significant change in diaphragm mass. However, this may simply reflect that in our study the period of oral breathing and possible nutritional deficit was limited to 13 days rather than 6 weeks. In addition, the magnitude of any nutritional deficit in our study is not known—it is simply based on lower body weight in the 15-day-old oral breathers, and the assumption that lack of olfaction will impair the neonates' ability to locate the mother and nipple. Furthermore, we show that forced oral breathing was associated with a stimulation of the stress response. Stress hormones, like glucocorticoids, have catabolic effects on skeletal muscle (Seene and Viru, 1982) linked to an increase in myofibril protein catabolism and a reduction in myofibril protein synthesis and protein stock (Odedra et al., 1983). In addition, forced oral breathing in an animal that is normally a nasal-breather could induce hypoxia (Tacx and Strack Van Schijndel, 2003), which can cause a loss of muscle mass (Boutellier et al., 1983). These three factors (nutritional and hormonal status, hypoxia) may therefore combine to produce a reduced growth of orofacial muscles in oral breathing animals.

The second point concerns the MHC isoform expression at 21 days of age. Only adult MHC isoforms were observed at 21 days of age in both control and oral breathing animals. This result is in agreement with the literature, which shows, for example, that expression of the neonatal MHC isoform in the rat diaphragm gradually disappears during post-natal life (Zhan et al., 1998). Previous studies have reported alterations in MHC isoform expression under a variety of physiological and pathological conditions but it had

never been demonstrated in an oral breathing model. Polymorphism in MHC isoform expression may have a profound effect on muscle fiber contractile and energetic properties (Watchko and Sieck, 1993; Sieck and Regnier, 2001). Indeed, fibers expressing MHC 1 generate less maximum specific force, slower shortening velocity and greater resistance to fatigue than fibers expressing fast MHC isoforms. Among fast fibers, those expressing MHC 2x and 2b generate greater maximum specific force, faster shortening velocity and lower resistance to fatigue than fibers expressing MHC 2a.

According to these observations, the present investigation shows that levator nasolabialis, related to nasal breathing, becomes more susceptible to fatigue following chronic nasal obstruction. Indeed, in oral breathing animals we observed a smaller relative decrease in MHC 2b compared to MHC 2a and 2x in levator nasolabialis. In addition, in oral breathing animals, the muscles related to mouth opening like masseter superficialis and anterior digastric present a smaller relative decrease in MHC 2a compared to MHC 2b and 2x, respectively. These muscles will be more susceptible to fatigue-resistance than control muscles. So, oral breathing rats present a profile in MHC adapted to the transition from nasal to oral breathing, facilitating respiration.

Nevertheless, the muscles related to oral breathing respond to the new environmental requirements by different changes in the relative expression of fast fatigable MHC isoforms: in masseter superficialis, oral breathing is linked to a greater decrease of MHC 2b compared to MHC 2a though in anterior digastric, MHC 2x declines more than MHC 2a. This result could be explained by a different control of muscle activity between MS and AD. Indeed, Van Wessel et al. (2005) have recently shown that masseter and digastric muscles presented differences in EMG activity (in term of bursts number) during daily activity in the rabbit. In contrast to anterior digastric, masseter muscle showed a bimodal burst distribution. The authors interpreted this result as the consequence of an additional postural activity for the masseter only, consisting of many short low-amplitude bursts. Indeed, in contrast to anterior digastric (jaw opening muscle), masseter superficialis could be related to a postural activity, which has been suggested as a low-amplitude muscle activity for the jaw closing muscles (Yemm, 1976; Rugh et al., 1979).

Our analysis of the masseter muscle revealed a greater decrease of MHC 2b, which is more fatigable compared to MHC 2x (Sieck et al., 1996). With regard to these observations, the differential changes observed for MHC isoform expression in muscles related to oral breathing could be interpreted as an adaptive process allowing the maintenance of the postural function of the masseter superficialis.

In general, the shift toward slower isoforms found in muscles related to mouth movements may be also explained by some possible specific changes in behavioral and electromyographic activity of orofacial muscles. In fact, stressful situations are known to enhance both behavioral and electromyographic activity of masticatory muscles (Ruf et al., 1997; Hartmann et al., 1999) and this hyperactivity would produce fast-to-slow transitions in fiber types as we found in masseter superficialis and anterior digastric (Sfondrini et al., 1996; Pette, 1998; Asmussen et al., 2003). In addition, chronic oral breathing could produce some behavioral modifications in both nursing and breathing behavior (mouth opening and rearing behavior) associated with alterations in specific electromyographic activity of orofacial muscles.

Hyperactivity and associated increased EMG activity is typically related to muscle hypertrophy (Roy et al., 1991) and, for this reason, we expected an increase in mass for anterior digastric and masseter superficialis linked to mouth movements. Consequently, the reduced growth of all orofacial muscles (including those involved in oral breathing) is a surprising result. Nevertheless, nasal obstruction and the associated switch to obligatory oral breathing represents a multi-factorial stressful situation and our findings must be considered as the result of a combination of factors acting in the same or in opposite directions.

Thus, behavior and related electromyographic activity are probably not the only factors acting upon the MHC distribution. Indeed, in a stressful situation, hormonal state could also be involved in the ultra-structural modifications observed in orofacial muscles. Indeed, glucocorticoids are known to produce specific changes in MHC isoform expression: type 2b fibers are the most susceptible to the catabolic effects of glucocorticoids (Kelly and Goldspink, 1982) and this specific effect could explain the greater decrease of MHC 2b found in masseter superficialis. In addition, Falduto et al. (1990) have described that glucocorticoid treatment

causes changes in the myosin phenotype in a fast-twitch muscle, the plantaris, by increasing MHC 2a expression in a similar manner to what we have found in masseter superficialis and anterior digastric. On the other hand, level of plasma thyroid hormones can be reduced by a stressful situation and these hormones are very important in the normal development of vertebrate skeletal muscle, notably in the muscles MHC distribution (D'Albis et al., 1990). For example, thyroid hormones are known to stimulate the transition from neonatal types to adult types and to anticipate the expression of MHC 2b during post-natal development (Butler-Browne et al., 1990). In brief, reduced thyroid hormones level and increased glucocorticoid levels could explain the fast-to-slow transitions found in muscles related to mouth opening in oral breathing animals and this should be confirmed.

Finally, nasal obstruction and the associated switch to oral breathing is known to produce some degree of hypoxia in humans and animals (Cavo et al., 1975; Tacx and Strack Van Schijndel, 2003), which can modify fiber type composition of some muscles like the diaphragm (Mortola and Naso, 1995), notably in severe conditions. Steinacker et al. (2000) have shown that, as the severity of arterial occlusive disease worsens, the gastrocnemius muscle increases the percentage of slow MHC isoforms instead of fast fatigable MHC isoforms. Thus, hypoxia could explain some modifications of MHC isoform expression observed following the induction of forced oral breathing, notably in masseter superficialis and anterior digastric, in which we have observed fast-to-slow transitions in fiber types.

In conclusion, the present study shows that the structure of orofacial muscles, and presumably the specific force developed by these muscles, can be altered by chronic oral breathing. Indeed, in animals exposed to chronic oral breathing, muscles involved with mouth movements presented an increased relative expression of fatigue resistant MHC isoforms, while muscles involved with nasal breathing presented an increased relative expression of fatigable MHC isoforms. These modifications could contribute partly to human pathology, and it would be interesting to specify the factors that act to produce these changes in muscular structure. For example, it would be judicious in a future study to evaluate the nursing behavior and the nutritional state of the individuals, to measure the plasma level of stress

hormones and the degree of hypoxia in pups exposed to chronic oral breathing.

### Acknowledgments

We wish to thank the laboratory of “biosciences de l’aliment” (UC 885, INRA-LBSA) for the use of their integration densitometer Bio-Rad GS-800. We thank Dr. Gillian Butler-Browne and Dr. Neal Miller for helpful comments and suggestions.

### References

- Asmussen, G., Schmalbruch, I., Soukup, T., Pette, D., 2003. Contractile properties, fiber types, and myosin isoforms in fast and slow muscles of hyperactive Japanese waltzing mice. *Exp. Neurol.* 184, 758–766.
- Bär, A., Pette, D., 1988. Three fast myosin heavy chains in adult rat skeletal muscle. *FEBS Lett.* 235, 153–155.
- Basset, J.R., West, S.H., 1997. Vascularization of adrenal cortex: its possible involvement of steroid hormone release. *Microsc. Res. Tech.* 36, 546–557.
- Betlejewski, S., 1998. Physiology and surgery of the nose. *Otolaryngol. Pol.* 52, 159–162.
- Bottinelli, R., Canepari, M., Pellegrino, M.A., Reggiani, C., 1996. Force-velocity properties of human skeletal muscle fibers: myosin heavy chain isoform and temperature dependence. *J. Physiol. Lond.* 495, 573–586.
- Boutellier, U., Howald, H., Di Prampero, P.E., Giezendanner, D., Cerretelli, D., Cerretelli, P., 1983. Human muscle adaptations to chronic hypoxia. In: Sutton, J.R., Houston, C.D., Jones, N. (Eds.), *Hypoxia, Exercise and Altitude*. New York, pp. 273–281.
- Butler-Browne, G.S., Barbet, J.P., Thornell, L.E., 1990. Myosin heavy and light chain expression during human skeletal muscle development and precocious muscle maturation induced by thyroid hormone. *Anat. Embryol. Berl.* 181, 513–522.
- Cavo, J.W., Kawamoto, S., Berlin, B.P., Zollinger, W., Ogura, J.H., 1975. Arterial blood gas changes following nasal packing in dogs. *Laryngoscope* 85, 2055–2068.
- D’Albis, A., Chanoine, C., Janmot, C., Mira, J.C., Couteaux, R., 1990. Muscle-specific response to thyroid hormone of myosin isoform transitions during rat postnatal development. *Eur. J. Biochem.* 193, 155–161.
- D’Albis, A., Couteaux, R., Janmot, C., Roulet, A., 1989. Specific programs of myosin expression in the postnatal development of rat muscles. *Eur. J. Biochem.* 183, 583–590.
- D’Albis, A., Pantaloni, C., Bechet, J.J., 1979. An electrophoretic study of native myosin isozymes and of their subunit content. *Eur. J. Biochem.* 99, 261–272.
- Darlene, D.F., Diorio, J., Plotsky, P.M., Meaney, M.J., 2002. Environmental enrichment reverses the effects of maternal separation on stress reactivity. *J. Neurosci.* 22, 7840–7843.
- Dekhuijzen, P.N., Gayan-Ramirez, G., Bisschop, A., De Bock, V., Dom, R., Decramer, M., 1996. Corticosteroid treatment and nutritional deprivation cause a different pattern of atrophy in rat diaphragm. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 153, 769–775.
- Falduto, M.T., Czerwinski, S.M., Hickson, R.C., 1990. Glucocorticoids-induced muscle atrophy prevention by exercise in fast-twitch fibers. *J. Appl. Physiol.* 69, 1058–1062.
- Gomez, F., Abdeljalil, L., De Kloet, E.R., Armario, A., 1996. Hypothalamic-pituitary-adrenal response to chronic stress in five inbred rat strains: differential responses are mainly located at the adrenocortical level. *Neuroendocrinology* 63, 327–337.
- Hartmann, N., Martrette, J.M., Westphal, A., Divry, M., 1999. Effects of controllable stress on masticatory behavior and muscle structure: partial protective effect of clomipramine. *Eur. J. Pharmacol.* 266, 19–26.
- Janmot, C., D’Albis, A., 1994. Electrophoretic separation of developmental and adult rabbit skeletal muscle myosin heavy chain isoforms: example of application to muscle denervation study. *FEBS Lett.* 353, 13–15.
- Keck, T., Leiacker, R., Meixner, D., Kuhnemann, S., Rettinger, G., 2001. Warming inhaled air in the nose. *HNO* 49, 36–40.
- Kelly, F.J., Goldspink, D.F., 1982. The differing responses of four muscle types to dexamethasone treatment in the rat. *Biochem. J.* 208, 147–151.
- Martrette, J.M., Hartmann, N., Vonau, S., Westphal, A., 1998. Effects of pre- and perinatal exposure to hypergravity on muscular structure development in rat. *J. Muscle Res. Cell Motil.* 19, 689–694.
- Martrette, J.M., Hartmann, N., Westphal, A., Favot, L., 2004. Effect of glucocorticoid receptor ligands on myosin heavy chains expression in rat skeletal muscles during controllable stress. *J. Muscle Res. Cell Motil.* 25, 297–302.
- Mattar, S.E., Anselmo-Lima, W.T., Valera, F.C., Matsumoto, M.A., 2004. Skeletal and occlusal characteristics in mouth-breathing pre-school children. *J. Clin. Pediatr. Dent.* 28, 315–318.
- Meisami, E., 1976. Effects of olfactory deprivation on post natal growth of the rat olfactory bulb utilizing a new method for production of neonatal unilateral anosmia. *Brain Res.* 107, 437–444.
- Mortola, J.P., Naso, L., 1995. Electrophoretic analysis of contractile proteins of the diaphragm in chronically hypoxic rats. *Am. J. Physiol.* 269, 371–376.
- Odedra, B.R., Bates, P.C., Millward, D.J., 1983. Time course of the effect of catabolic doses of corticosterone on protein turnover in rat skeletal muscle and liver. *Biochem. J.* 214, 617–627.
- Pette, D., 1998. Training effects on the contractile apparatus. *Acta Physiol. Scand.* 162, 367–376.
- Pette, D., Staron, R.S., 1990. Cellular and molecular diversities of mammalian skeletal muscle fibers. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 116, 1–76.
- Pette, D., Vrbova, G., 1999. What does chronic electrical stimulation teach us about muscle plasticity? *Muscle Nerve* 22, 666–677.
- Polla, B., Bottinelli, R., Sandoli, D., Sardi, C., Reggiani, C., 1994. Cortisone induced changes in myosin heavy chain distribution in respiratory and hindlimb muscles. *Acta Physiol. Scand.* 151, 353–361.
- Raadsheer, M.C., Van Eijden, T.M., Van Ginkel, F.C., Prahlandersen, B., 1999. Contribution of jaw muscle size and cranio-

- facial morphology to human bite force magnitude. *J. Dent. Res.* 78, 31–42.
- Roy, R.R., Baldwin, K.M., Edgerton, V.R., 1991. The plasticity of skeletal muscle, effects of neuromuscular activity. In: Holloszy, J. (Ed.), *Exercise and Sports Sciences Reviews*. Williams and Wilkins, Baltimore, pp. 269–312.
- Ruf, S., Cecere, F., Kupfer, J., Panzer, H., 1997. Stress-induced changes in the functional electromyographic activity of the masticatory muscles. *Acta Odontol. Scand.* 55, 44–48.
- Rugh, J.D., Drago, C.J., Barghi, N., 1979. Comparison of electromyographic and phonetic measurements of vertical rest position. *J. Dent. Res.* 58, 316.
- Schlenker, W.L., Jenning, B.D., Jeiroudi, M.T., Caruso, J.M., 2000. The effects of chronic absence of active nasal respiration on the growth of the skull: a pilot study. *Am. J. Orthod. Dentofacial Orthop.* 117, 706–713.
- Seene, T., Viru, A., 1982. The catabolic effect of glucocorticoids on different types of skeletal muscle fibres and its dependence upon muscle activity and interaction with anabolic steroids. *J. Steroid Biochem.* 16, 349–352.
- Sfondrini, G., Reggiani, C., Gandini, P., Bovenzi, R., Pellegrino, M.A., 1996. Adaptations of masticatory muscles to a hyperpropulsive appliance in the rat. *Am. J. Orthod. Dentofacial Orthop.* 110, 612–617.
- Sieck, G.C., Fournier, M., Prakash, Y.S., Blanco, C.E., 1996. Myosin phenotype and SDH enzyme variability among motor unit fibers. *J. Appl. Physiol.* 80, 2179–2189.
- Sieck, G.C., Regnier, M., 2001. Invited review: plasticity and energetic demands of contraction in skeletal and cardiac muscle. *J. Appl. Physiol.* 90, 1158–1164.
- Singh, P.J., Tobach, E., 1975. Olfactory bulbectomy and nursing behavior in rat pups (Wistar DAB). *Dev. Psychobiol.* 8, 151–164.
- Song, H.G., Pae, E.K., 2001. Changes in orofacial muscle activity in response to changes in respiratory resistance. *Am. J. Orthod. Dentofacial Orthop.* 119, 436–442.
- Soucek, G., Breit, S., König, H.E., Liebich, H.G., 1999. Zur funktionellen bedeutung der muskulatur an der äußeren nase beim schein 28, 307–314 (in German).
- Spyropoulos, M.N., Tsolakis, A.I., Alexandridis, C., Katsavrias, E., Dontas, I., 2002. Role of suprahyoid musculature on mandibular morphology and growth orientation in rats. *Am. J. Orthod. Dentofacial Orthop.* 122, 392–400.
- Steinacker, J.M., Opitz-Gress, A., Baur, S., Lormes, W., Bolkart, K., Sunder-Plassman, L., Liewald, F., Lehmann, M., Liu, Y., 2000. Expression of myosin heavy chain isoforms in skeletal muscle of patients with peripheral arterial occlusive disease. *J. Vasc. Surg.* 31, 443–449.
- Swynghedauw, B., 1986. Developmental and functional adaptation of contractile proteins in cardiac and skeletal muscles. *Physiol. Rev.* 66, 710–771.
- Tacx, A.N., Strack Van Schijndel, R.J., 2003. Arterial hypoxemia due to packing of the nose. *Ned. Tijdschr. Geneesk.* 147, 1747–1749.
- Talmadge, R.J., Roy, R.R., 1993. Electrophoretic separation of skeletal muscle myosin heavy chain. *J. Appl. Physiol.* 75, 2337–2340.
- Van Wessel, T., Langenbach, E.J., Van Ruijven, L.J., Brugman, P., Van Eijden, T.M., 2005. Daily number and lengths of activity bursts in rabbit jaw muscles. *Eur. J. Neurosci.* 21, 2209–2216.
- Waguespack, A.M., Reems, M.R., Butman, M.L., Cherry, J.A., Coppola, D.M., 2005. Naris occlusion alters olfactory marker protein immunoreactivity in olfactory epithelium. *Brain Res.* 1044, 1–7.
- Watchko, J.F., Sieck, G.C., 1993. Respiratory muscle fatigue resistance relates to myosin phenotype and SDH activity during development. *J. Appl. Physiol.* 75, 1341–1347.
- Yang, K., Zeng, X., Yu, M., 2002. A study on the difference of craniofacial morphology between oral and nasal breathing children. *Zhonghua Kou Qiang Yi Xue Za Zhi* 37, 385–387.
- Yemm, R., 1976. The role of tissue elasticity in the control of mandibular resting posture. In: Anderson, D.J., Matthews, B. (Eds.), *Mastication*. John Wright, Bristol, pp. 81–89.
- Zhan, W.Z., Watchko, J.F., Prakash, Y.S., Sieck, G.C., 1998. Isotonic contractile and fatigue properties of developing rat diaphragm muscle. *J. Appl. Physiol.* 84, 1260–1268.

## Annexe 2





# Effects of early olfactory deprivation on novelty-seeking behavior and primary and secondary lymphoid organs in young rats

Mathieu Gelhaye, Marie Trabalon, Jean-Marc Martrette,  
Christine Legrand-Frossi\*

*Physiologie du Comportement, Faculté des Sciences et Techniques, DEPE, IPHC, UMR-CNRS 7178, BP 239, 54506 Vandœuvre-lès-Nancy, France*

Received 24 February 2006; received in revised form 23 May 2006; accepted 26 May 2006

## KEYWORDS

Nasal obstruction;  
Post-natal development;  
Novelty-seeking behavior;  
Corticosterone;  
Lymphocytes proliferation

**Summary** The aim of this study was to investigate the effects of an early olfactory deprivation on novelty-seeking behavior and lymphoid organs during post-natal development in rats. Therefore, we performed a bilateral nasal obstruction on 8-day-old rats and we studied its effects at 21 days of age. Animals exposed to nasal obstruction presented an increased plasma corticosterone level, an adrenal hypertrophy more marked in females (+68% in females and +29% in males compared to sham group), a reduced growth of olfactory bulbs only in females (−43% compared to sham group) and an impaired novelty-seeking behavior, which seemed also more marked in females. Moreover, thymus specific weight and ConA-induced proliferative activity of thymocytes were diminished after induction of nasal obstruction in females but not in males. At last, spleen specific weight was not affected by nasal obstruction, although mitogen-induced proliferative activity of splenocytes was diminished in both sexes. These data showed that early olfactory deprivation by nasal obstruction was associated with some behavioral, endocrine and immunological alterations, which may have serious consequences for the health and the social status of the individuals.

© 2006 Elsevier Ltd. All rights reserved.

## 1. Introduction

Several ontogenic studies demonstrated the importance of early olfactory experiences in the neurobehavioral development of rodents (Cooper-smith and Leon, 1984). Newborn altricial mammals

\*Corresponding author. Tel.: +33 03 83 68 42 62.

E-mail address: christine.legrand-frossi@scbiol.uhp-nancy.fr (C. Legrand-Frossi).

of many species learn the odor of their mother and use it in identifying and orienting to the mother. As the mother is the sole source of food, warm and protection, learning this odor is critical for the survival of the newborn (Sullivan, 2003). In the rat neonate, olfactory cues from the mother and siblings are crucial in the establishment of early behaviors such as home orientation (Sczerzenie and Hsiao, 1977), huddling (Brunjes and Alberts, 1979) and nursing (Hongo et al., 2000). A chronic olfactory deficit is therefore able to involve many consequences on the homeostasis of the young individual as well as changes lasting until the adulthood. For these different reasons, early olfactory deprivation can be regarded as a multifactorial stressful situation: in addition to the loss of olfactory input, other factors such as metabolic and nutritional changes could activate the hypothalamo-pituitary-adrenal (HPA) response to stress with glucocorticoids as the final effectors.

This suggestion is notably supported by the many studies dealing with consequences of bilateral olfactory bulbectomy in adult rats. Indeed this procedure generates major behavioral and endocrine alterations such as augmented stress-like behaviors (Song et al., 1996) and increased corticosterone level (Marcilhac et al., 1997). Furthermore, such bulbectomy produces immunological changes like reduced spleen and thymus weights (Song and Leonard, 1993) and decreased mitogen-stimulated proliferation of blood lymphocytes (Song and Leonard, 1995). These changes could be explained at least partially by the immuno-suppressive effects of glucocorticoids, which are generally considered to have anti-inflammatory actions on immune system (Bateman et al., 1989). Nevertheless, bilateral olfactory bulbectomy is a permanent procedure not imitating the stressful situations that can usually occur under natural conditions. This method is then generally used as a human model of depression (see Song and Leonard, 2005 for further details). There are other methods of olfactory deprivation closer to the pathological conditions met in nature, where the lack of olfaction is generally associated with a nasal obstruction (Seiden and Duncan, 2001). For example, the main technique employed to produce transient olfactory deprivation in neonatal animals consists in the obstruction of the nasal cavities, usually using a brief cauterization reducing airflow into the nasal cavity and thus odorant exposure (Meisami, 1976). The nostril cauterization generates numerous effects on the adult olfactory bulb, including reduction of its volume and a variety of physiological and biochemical alterations (Brunjes et al., 1985; Brunjes, 1994). Furthermore, we have previously shown that nasal obstruction by cauterization in 8-day-old female rats

was associated with a reduced growth of olfactory bulbs at 21 days of age and hypertrophied adrenal glands that could be linked to a stress response (Gelhaye et al., 2006). However, the behavioral and immunological consequences of the bilateral nasal obstruction were never studied in neonates.

In order to fill this lack we propose to perform a bilateral nostril cauterization to induce an olfactory deprivation on 8-day-old rats of both sexes and to study its effects on behavior and immune functions at the age of weaning. Hence, the first aim of the present investigation was to know whether early olfactory deprivation by nasal obstruction was associated with the establishment of a stress response and with behavioral modifications. Thus, the weight of adrenal glands, the plasma corticosterone level and the novelty-seeking behavior were investigated. The second aim was then to explore the consequences on primary and secondary lymphoid organs, focusing more particularly on the mitogen-induced proliferation of thymocytes and splenocytes. Lastly, the literature consistently reporting existence of sex-differences in adrenal responsiveness after induction of postnatal chronic stress (Rhees et al., 2001; Knuth and Etgen, 2005), individual data was recorded and analyzed in order to investigate the potential sex-dependent effects of early nasal obstruction.

## 2. Methods

### 2.1. Animal care

Thirty-nine mixed-sex litters (Wistar, iops IFFA-CREDO) from post-natal day (PND) 8–21 were used. These animals were born in the laboratory and housed in standard cages under controlled temperature conditions ( $22 \pm 1^\circ\text{C}$ ). Food and water were available ad libitum during the whole experiment. From the birth, the litters were kept on a reversed 12:12 light–dark cycle (dark period 0800–2000 h) and were culled to five males and five females to ensure normal body growth.

### 2.2. Nasal obstruction procedure

All experimental procedures were conforming to the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals published by the National Institutes of Health (No. 85-23, revised 1996) and the recommendations edited by the European Community Council for the Ethical Treatment of Animals (No. 86/609/EEC). All efforts were made to minimize animal suffering.

At PND 8, the litters were randomly divided into three experimental groups. Untreated group (UT) was defined by the complete absence of manipulation. Sham group (SH) and animals with nasal obstruction (NO) were first anesthetized by hypothermia (10 min at  $-18^{\circ}\text{C}$ ). Once the litters were anesthetized, a bilateral nasal obstruction was performed on NO animals as previously described by Meisami (1976) and Waguespack et al. (2005). The selected method consisted in the cauterization of the external nostrils, which is the most common and simple procedure allowing reversible nasal obstruction in neonates. The tissue surrounding the external nostrils was burned by placing a surgical cauterizing instrument on the nostrils, consequently occluding the orifice of the nostrils. This procedure induced a complete nasal obstruction between PND 8 and PND 14 with 100% of the nostrils reopened at PND 16. In sham group, the nostrils were not sealed but the tissue above them was burned by placing the cauterizing instrument about 1–2 mm above each nostril. After the cauterization, the burn was washed with chlortetracycline (Aureomycine Evans 3%) to prevent a possible infection. SH and NO pups were kept warm ( $37^{\circ}\text{C}$ ) for 1 h and they were then returned to the mothers.

In order to avoid interferences between different experiments, the litters were randomly divided into animals used for behavioral analysis (15 litters,  $n = 16$  rats per sex and per group), animals used for corticosterone assay (10 litters,  $n = 8$  rats per sex and per group) and animals used for immunologic measurements (14 litters,  $n = 8$  rats per sex and per group).

### 2.3. Behavioral analysis

To determine whether nasal obstruction was associated with an increased level of anxiety, the rats were subjected to a free-choice procedure in which animals could choose freely to approach or escape the novelty as they found it attractive or aversive. This novelty-seeking behavior was evaluated at PND 21 according to the technique described by Will et al. (1986). All behavioral observations were made during the dark period between 0900 and 1100 h and the apparatus was maintained in the same position in the room throughout the duration of the study.

The rats were placed in boxes ( $30 \times 20 \times 20$  cm), each subdivided into six equal square units separated by walls and interconnected by  $4 \times 5$  cm holes. The animals were first tested for their reactions with regard to a novel object introduced in their familiar environment before being tested for their reactions to an unfamiliar environment.

*Reactions towards a novel object.* Each rat was placed in one-half of the box divided length-wise by three closed guillotine doors. The floor of the occupied half was covered with sawdust and the rat was given access to food and water ad libitum. Twenty-four hours after placement in the box, a novel object was placed in the middle unit of the familiar side while the unfamiliar half remained inaccessible. The novel object consisted of a rubber cap, 4 cm high and about 3 cm in diameter. Each rat was observed for 10 min and the experimenter recorded the latency of the first interaction and the total number of interactions. Following this test, the novel object was removed.

*Reactions towards a novel environment.* One hour after testing the reactions to a novel object, the guillotine doors were opened and the rat was allowed to enter any unit of both the familiar and novel compartments of the apparatus. Each rat was then observed during 10 min for its reactions to the novel environment. The number of novel and familiar units entered during 10 min and the time spent into each compartment were recorded.

### 2.4. Samples collection

At PND 9 and PND 21, immediately following sacrifice, intra-cardiac blood samplings ( $500 \mu\text{l}$ ) were performed between 1100 and 1200 h for corticosterone measurements. Blood was collected within 1–2 min into sterile heparinized syringes fitted with a 26-G needle. Plasma was immediately separated from cells by centrifugation at  $4^{\circ}\text{C}$  (15 min at 3000 rpm) then the extracts were stored at  $-18^{\circ}\text{C}$  until the time of the assay.

After blood sampling, animals were weighed; olfactory bulbs and adrenal glands were bilaterally removed and weighed. In addition, spleen and thymus were removed for the lymphocyte proliferation assay. These organs were weighed and placed into sterile plastic tubes containing 10 ml of RPMI 1640 medium (Gibco, Scotland, UK) supplemented with 25 mM Hepes, 2 mM L-glutamine (Gibco, Scotland, UK) and 10% of fetal calf serum.

### 2.5. Corticosterone assay

In order to assess the adrenal response after the induction of early nasal obstruction, the corticosterone concentration was measured without extraction procedure, using a commercially available EIA kit and according to the manufacturer's guidelines (Assay Designs Inc., USA). The concentration of corticosterone in plasma samples was calculated from a standard curve and expressed as ng/ml. The

intra- and inter-assay coefficients of variation were under 8.4% and 13.1%, respectively.

## 2.6. Immunologic measurements

The mitogens concanavalin A (ConA) and phytohemagglutinin (PHA) were used to assess lymphocytes responsiveness in the spleen and thymus, which were disaggregated into RPMI 1640 tissue culture medium enriched with 25 mM HEPES, 2 mM L-glutamine and 10% of fetal calf serum. The lymphocytes counts in a single cell suspension were determined with a hemocytometer and the suspension was adjusted to a working concentration of  $4 \times 10^6$  cells/ml. Splenocytes or thymocytes suspension (50  $\mu$ l) were added in triplicate into the wells of a 96-well flat-bottom tissue culture plate containing 50  $\mu$ l of medium or mitogens ConA or PHA at a final concentration of 2.5  $\mu$ g/ml and 4%, respectively. The plates were incubated for 48 h at 37 °C in a humidified atmosphere with 5% CO<sub>2</sub>.

Twenty microliters of MTS tetrazolium compound (Promega Corporation, Madison, USA) were then added into each well in order to determinate the number of viable cells. The plates were incubated for 4 h at 37 °C in a humidified atmosphere with 5% CO<sub>2</sub> and the absorbance (OD) at 490 nm was recorded using a 96-well plate reader (BioRad, M450 microplate reader).

An index of proliferation (IP) was then calculated as follows:

$$IP = \frac{OD(490 \text{ nm}) \text{ of stimulated cells}}{OD(490 \text{ nm}) \text{ of non-stimulated cells}}$$

## 2.7. Data analysis

Data were expressed as group means  $\pm$  SE. Statistical analysis was performed by means of statistical software (Statview V5.0, Abacus concepts Inc., Berkeley, CA). Since all data were normally distributed, after a two-way analysis of variance (sex \* treatment), the PLSD Fisher procedure was used to establish the inter-group comparison. Differences were considered significant at  $p < 0.05$ .

## 3. Results

### 3.1. Novelty-seeking behavior

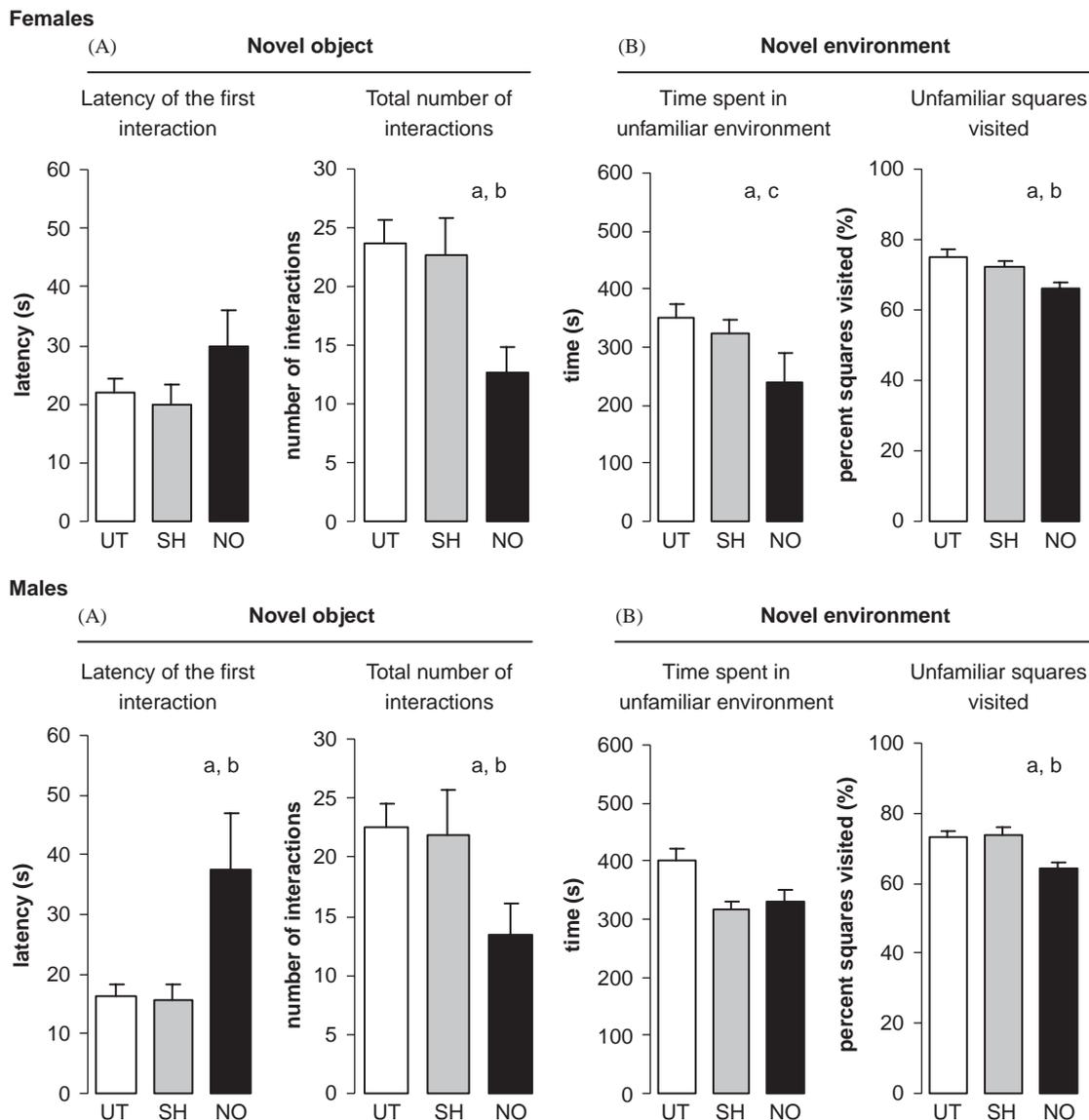
When tested for their reaction to a novel object introduced into their familiar environment (Fig. 1A),

a significant difference was measured in the latency of the first interaction between the experimental groups ( $F = 2.67$ ,  $p = 0.027$ ). Indeed NO males exhibited a greater latency of the first interaction compared to untreated and sham males ( $p = 0.006$  versus untreated;  $p = 0.005$  versus sham), whereas there was no significant difference in females ( $p = 0.269$  versus untreated;  $p = 0.149$  versus sham). Nevertheless, some NO individuals (two females and one male) did not carry out any contact with the object during the observation period and were not taken into account in these results. Besides, there was a significant difference for the total number of interactions between the experimental groups ( $F = 5.75$ ,  $p = 0.005$ ). Indeed NO rats made less contacts with the object than untreated or sham rats in females ( $p = 0.005$  versus untreated;  $p = 0.007$  versus sham) and in males ( $p = 0.024$  versus untreated;  $p = 0.041$  versus sham). Compared to sham group, the reduction percentage was of 44% in NO females and of 38% in NO males.

When tested for their reaction to a novel environment (Fig. 1B), all animals made clear distinction between the novel and familiar environments irrespective of their treatment. There was a significant difference in the time spent into the unfamiliar side ( $F = 3.14$ ,  $p = 0.014$ ) and the percentage of unfamiliar visited squares ( $F = 11.68$ ,  $p < 0.0001$ ). Indeed NO females spent less time in the novel side compared to their male counterparts and to untreated females (respectively  $p = 0.040$  and  $p = 0.007$ ). Furthermore, the percentage of unfamiliar squares visited was smaller in NO females ( $p = 0.003$  versus untreated;  $p = 0.034$  versus sham) and in NO males ( $p = 0.003$  versus untreated;  $p = 0.0008$  versus sham). At last, that it is for the reactions towards a novel object or a novel environment, no significant difference was detected between untreated and sham rats ( $0.106 < p < 0.837$ ).

### 3.2. Body weight

Table 1 shows that there was no significant difference for body weight at PND 21 between the experimental groups in both sexes ( $F = 1.53$ ,  $p = 0.197$ ). Nevertheless, since there was a 15% reduction of body weight in NO females compared to untreated females (respectively  $44.8 \pm 1.8$  versus  $37.9 \pm 2.7$  g), the organ weights were presented and discussed in specific values in the remaining of the results and in the discussion.



**Figure 1** Impact of early nasal obstruction on novelty-seeking behavior at 21 days of age in untreated group (UT), sham group (SH) and animals with nasal obstruction (NO). (A) Reactions to a novel object and (B) reactions to a novel environment. Values are means  $\pm$  SE.  $n = 16$  rats per group and per sex. Analysis of two-way ANOVA, sex \* treatment effects: latency of the first interaction:  $F = 2.67$  at five degrees of freedom,  $p = 0.027$  (means excluding the individuals not carrying out any interaction with the object during the observation period, i.e. two NO females and one NO male); time spent in unfamiliar environment:  $F = 3.14$  at five degrees of freedom,  $p = 0.014$ ; treatment effect: number of interactions:  $F = 5.75$  at two degrees of freedom,  $p = 0.005$ ; unfamiliar squares visited:  $F = 11.68$  at two degrees of freedom,  $p < 0.0001$ . Analysis of Fisher PLSD: <sup>a</sup> $p < 0.05$  versus untreated; <sup>b</sup> $p < 0.05$  versus sham; <sup>c</sup> $p < 0.05$  versus male counterparts.

### 3.3. Olfactory bulb weight

To test the effect of early nasal obstruction on the development of olfactory bulbs, they were removed bilaterally at PND 21 and were weighed (Table 1). There was a significant difference between the experimental groups and between the sexes ( $F = 7.55$ ,  $p < 0.0001$ ). There was no significant difference between

untreated and sham animals. Besides olfactory bulb weight diminished under nasal obstruction in females ( $p < 0.0001$  versus untreated and sham) but not in males ( $p = 0.598$  versus untreated;  $p = 0.783$  versus sham). Compared to sham females, the reduction percentage was of 43% in NO females. In addition, the difference of olfactory bulb growth observed between NO females and NO males was significant

**Table 1** Body weight (g), olfactory bulb and adrenal gland specific weights (mg/g) at 21 days of age in untreated group, sham group and animals exposed to nasal obstruction.

		Body weight (g)	Olfactory bulb specific weight (mg/g)	Adrenal gland specific weight (mg/g)
Females	Untreated	44.8 ± 1.8	1.01 ± 0.05	0.44 ± 0.02
	Sham	45.1 ± 2.3	0.91 ± 0.06	0.37 ± 0.03
	Nasal obstruction	37.9 ± 2.7	0.48 ± 0.03 <sup>a,b,c</sup>	1.17 ± 0.09 <sup>a,b,c</sup>
Males	Untreated	43.5 ± 1.5	0.81 ± 0.09	0.41 ± 0.03
	Sham	47.6 ± 3.3	0.88 ± 0.07	0.36 ± 0.03
	Nasal obstruction	43.2 ± 5.3	0.86 ± 0.08	0.51 ± 0.04 <sup>b</sup>

Values are means ± SE.  $n = 16$  rats per group and per sex. Analysis of two-way ANOVA, sex \* treatment effects: body weight:  $F = 1.53$  at five degrees of freedom,  $p = 0.197$ ; olfactory bulb weight:  $F = 7.55$  at five degrees of freedom,  $p < 0.0001$ ; adrenal gland weight:  $F = 46.29$  at five degrees of freedom,  $p < 0.0001$ . Analysis of Fisher PLSD: <sup>a</sup> $p < 0.05$  versus untreated; <sup>b</sup> $p < 0.05$  versus sham; <sup>c</sup> $p < 0.05$  versus male counterparts.

(respectively  $0.48 \pm 0.03$  versus  $0.86 \pm 0.08$  mg/g;  $p < 0.0001$ ).

### 3.4. Adrenal gland weight

To test the effect of early nasal obstruction on the development of adrenal glands, they were removed bilaterally at PND 21 and were weighed (Table 1). There was a significant difference between the experimental groups and between the sexes ( $F = 46.29$ ,  $p < 0.0001$ ). Nasal obstruction was thus associated with a significant increase of adrenal gland weight in females ( $p < 0.0001$  versus untreated and sham). Compared to sham group, the augmentation percentage was of 68% in NO females. The adrenal gland weight was also increased in NO males compared to sham animals (+29%;  $p = 0.013$ ) but not compared to untreated males ( $p = 0.112$ ). Finally the specific weight of adrenal glands was significantly greater in NO females compared to their male counterparts:  $1.17 \pm 0.09$  versus  $0.51 \pm 0.04$  mg (+56%;  $p < 0.0001$ ), respectively.

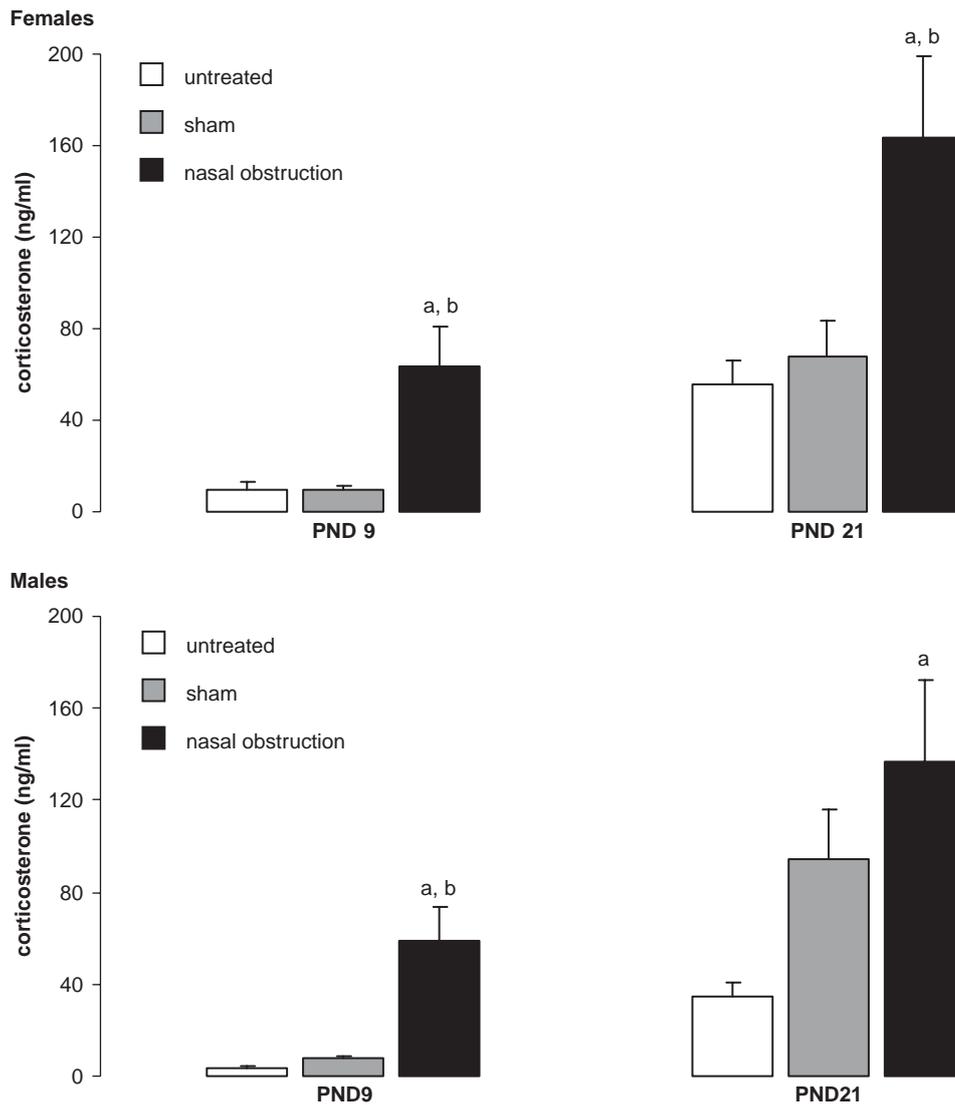
### 3.5. Corticosterone assay

As shown in Fig. 2, plasma corticosterone levels were significantly different between the experimental groups at PND 9 ( $F = 21.40$ ,  $p < 0.0001$ ) and PND 21 ( $F = 10.31$ ,  $p = 0.0002$ ). Twenty-four hours after the treatment, the nasal obstruction was associated with an augmentation of corticosterone in both sexes (females:  $p = 0.0004$  versus untreated,  $p = 0.0005$  versus sham; males:  $p = 0.0002$  versus untreated,  $p = 0.0008$  versus sham). At PND 21, the plasma corticosterone level was significantly increased in NO females ( $163.7 \pm$

$35.2$  ng/ml) compared to untreated ( $55.4 \pm 10.9$  ng/ml,  $p = 0.002$ ) and sham females ( $67.9 \pm 15.3$  ng/ml,  $p = 0.008$ ). In addition, the plasma corticosterone level was significantly increased in NO males ( $136.8 \pm 35.4$  ng/ml) compared to untreated males ( $34.2 \pm 6.1$  ng/ml,  $p = 0.004$ ) but not to sham males ( $94.1 \pm 21.6$  ng/ml,  $p = 0.223$ ). At last, the values of plasma corticosterone were comparable between untreated and sham animals in both sexes at the two tested ages (PND 9:  $p = 0.989$  in females,  $p = 0.742$  in males; PND 21:  $p = 0.718$  in females;  $p = 0.090$  in males).

### 3.6. Thymus weight and proliferative response

Fig. 3 shows that the total number of thymocytes and the PHA-induced proliferative response were not affected by nasal obstruction ( $F = 1.93$ ,  $p = 0.102$  and  $F = 2.24$ ,  $p = 0.068$ , respectively). In contrast, there was a significant difference for thymus specific weight and thymocyte proliferative response to ConA between the experimental groups and between the sexes ( $F = 5.45$ ,  $p = 0.0004$  and  $F = 2.19$ ,  $p = 0.048$ , respectively). In NO females, thymus specific weight and thymocyte proliferative response to ConA was significantly diminished compared to untreated females ( $p < 0.0001$  and  $p = 0.011$ , respectively) and sham females ( $p = 0.004$  and  $p = 0.019$ , respectively). In males, there was no significant difference for the thymus specific weight, the number of thymocytes and the mitogen-induced proliferative activity between the three experimental groups ( $0.083 < p < 0.857$ ). Nevertheless, NO males exhibited a greater thymocyte proliferative response to ConA compared to their female counterparts



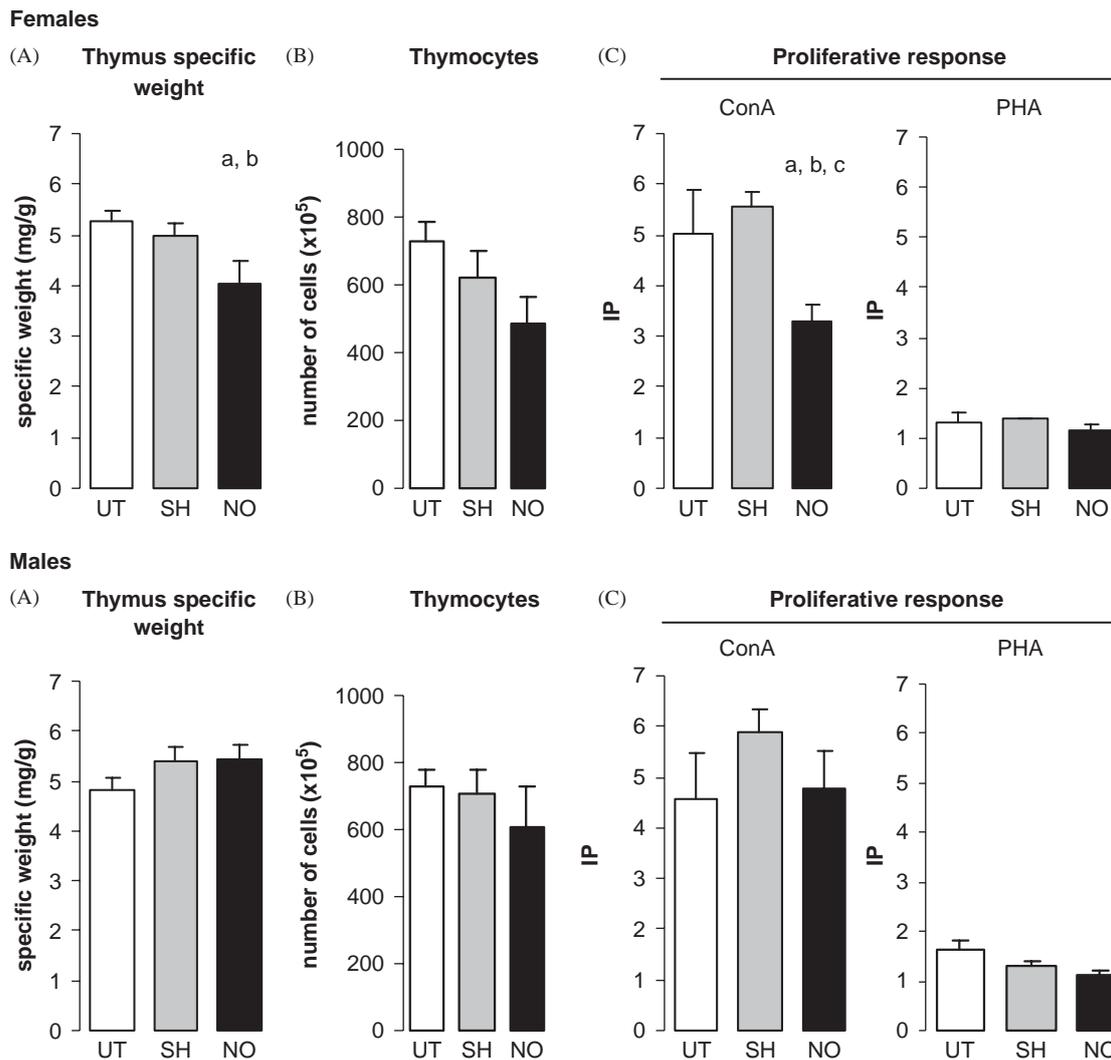
**Figure 2** Impact of early nasal obstruction on plasma corticosterone level at postnatal day (PND) 9 and 21 in untreated group, sham group and animals with nasal obstruction. Values are means  $\pm$  SE.  $n = 8$  rats per group and per sex. Analysis of two-way ANOVA, treatment effect: PND 9:  $F = 21.40$  at five degrees of freedom,  $p < 0.0001$ ; PND 21:  $F = 10.31$  at five degrees of freedom,  $p = 0.0002$ . Analysis of Fisher PLSD: <sup>a</sup> $p < 0.01$  versus untreated; <sup>b</sup> $p < 0.01$  versus sham.

( $p = 0.023$ ). At last, the thymus weight, the number of thymocytes and the mitogen-induced thymocyte proliferation were comparable at PND 21 between untreated and sham animals in both sexes ( $0.102 < p < 0.932$ ).

### 3.7. Spleen weight and proliferative response

As shown in Fig. 4, spleen specific weight and total number of splenocytes were not affected by nasal obstruction in both sexes ( $F = 1.19$ ,  $p = 0.326$  and  $F = 1.20$ ,  $p = 0.317$ , respectively). In contrast, there was a significant difference for splenocyte

proliferative response with both mitogens ( $F = 2.44$ ,  $p = 0.046$  for ConA;  $F = 3.29$ ,  $p = 0.012$  for PHA), which was decreased after induction of bilateral nasal obstruction in females (ConA:  $p = 0.032$  versus untreated; PHA:  $p = 0.007$  versus untreated;  $p = 0.0009$  versus sham). However, there was no significant difference between SH and NO females for ConA ( $p = 0.086$ ). In NO males, the proliferative response was also diminished but only with the ConA ( $p = 0.029$  versus untreated;  $p = 0.032$  versus sham) and not with the PHA ( $p = 0.121$  versus untreated;  $p = 0.160$  versus sham). At last, mitogen-induced splenocyte proliferation was comparable between untreated and sham animals in both sexes ( $0.279 < p < 0.913$ ) and



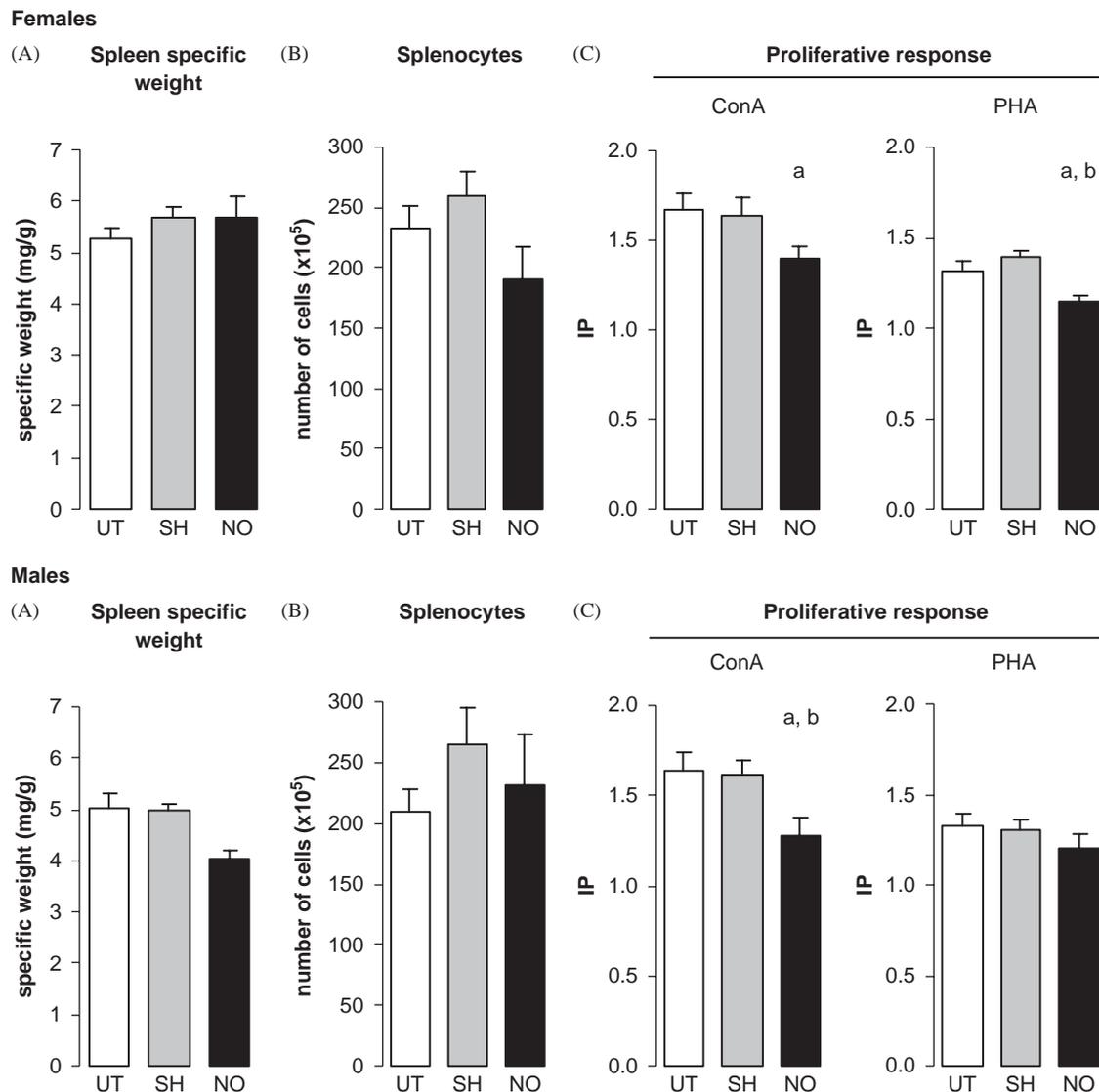
**Figure 3** Thymus specific weight (A), total number of thymocyte (B) and thymocyte response to ConA and PHA (C) at 21 days of age in untreated group (UT), sham group (SH) and animals with nasal obstruction (NO). Values are means  $\pm$  SE.  $n = 8$  rats per group and per sex. Analysis of two-way ANOVA, sex \* treatment effects: thymus specific weight:  $F = 5.45$  at five degrees of freedom,  $p = 0.0004$ ; number of thymocytes:  $F = 1.93$  at five degrees of freedom,  $p = 0.102$ ; response to ConA:  $F = 2.19$  at five degrees of freedom,  $p = 0.049$ ; response to PHA:  $F = 2.24$  at five degrees of freedom,  $p = 0.068$ . Analysis of Fisher PLSD: <sup>a</sup> $p < 0.05$  versus untreated; <sup>b</sup> $p < 0.05$  versus sham; <sup>c</sup> $p < 0.05$  versus male counterparts.

between the sexes within the same experimental group ( $0.218 < p < 0.896$ ).

#### 4. Discussion

Our results showed that early nasal obstruction was associated with an impairment of novelty-seeking behavior, which seemed more marked in females. Indeed, on one hand there were two NO females that did no contact with the object; on the other hand females exposed to nasal obstruction spent less time in the novel side compared to their male counterparts. This is consistent with a previous

report that considered that novelty-seeking behavior was capable to reflect the activation of HPA axis (Bardo et al., 1996). Two interrelated components must be considered to explain the behavioral changes observed after induction of early nasal obstruction. First, the lack of olfaction accompanying the nasal obstruction had to modify the perception of the environment and could thus act on the exploratory behavior. In this case, animals with nasal obstruction should spend more time to explore the novelty, denoted as amplified "explorative" factor by Exner and Clark (1993). Second, the impairment of environment recognition could involve an increased level of anxiety being able to influence the reactions to the novelty.



**Figure 4** Spleen specific weight (A), total number of splenocyte (B) and splenocyte response to ConA and PHA (C) at 21 days of age in untreated group (UT), sham group (SH) and animals with nasal obstruction (NO). Values are means  $\pm$  SE.  $n = 8$  rats per group and per sex. Analysis of two-way ANOVA, sex \* treatment effects: spleen specific weight:  $F = 1.19$  at five degrees of freedom,  $p = 0.326$ ; number of splenocytes:  $F = 1.20$  at five degrees of freedom,  $p = 0.317$ ; response to ConA:  $F = 2.44$  at five degrees of freedom,  $p = 0.046$ ; response to PHA:  $F = 3.29$  at five degrees of freedom,  $p = 0.012$ . Analysis of Fisher PLSD: <sup>a</sup> $p < 0.05$  versus untreated; <sup>b</sup> $p < 0.05$  versus sham.

Animals with nasal obstruction should then spend less time in interaction with the novelty and should thus present an amplified “escape” factor. Hence, our results seem to convey an increased level of anxiety rather than a diminution of olfactory perception. However, further investigations such as evaluation of the olfactory abilities necessary to identifying and orienting to the mother and the motor responses in a novel environment will be needed to clarify this issue. Furthermore, a novelty-seeking behavior that is strongly marked during the period of development results in predisposition to risk-taking behaviors during the adult-

hood (Wills et al., 1994; Abreu-Villaca et al., 2006). Consequently, one can wonder whether the low level of novelty-seeking behavior observed in young animals exposed to nasal obstruction will result later in long lasting behavioral modifications such as difficulties to finding new sources of food or mates for instance.

In our experiment and although the nostrils were reopened at PND 16, the lack of olfaction was associated with an attenuated growth of olfactory bulbs observed in females at PND 21. This finding confirms our previous results showing that nasal obstruction by nostril cauterization at PND 8

impaired the olfactory bulb growth in 21-day-old females (Gelhaye et al., 2006). Interestingly, the present study revealed that this impairment did not relate to the males, a result that could be explained by the high levels of testosterone present in neonatal males. Indeed testosterone is known to exert a preventive action on natural neuronal death (Nordeen et al., 1985) and lead to a greater rate of neo-neurogenesis (Peretto et al., 2001) in the sexually dimorphic brain structures as the accessory olfactory bulb (Simerly, 2005). However, the functional deteriorations and recovery of olfaction after the reopening of the nostrils were not tested in the present study. The T-maze tests currently conducted at the laboratory will allow us to specify the olfactory abilities of the individuals after induction of early nasal obstruction. In females, the atrophy of olfactory bulbs must be indeed associated with a lack of olfaction, which could disturb the olfactory memory and the orientation to the mother, the nest and the nipples. This lack could disturb the establishment of early behaviors such as huddling and nursing (Brunjes and Alberts, 1979; Hongo et al., 2000).

Furthermore, Van Den Hove et al. (2006) have recently shown that prenatal stress exerted a negative effect on neonatal cell proliferation in the olfactory bulbs. An effect of corticosterone on the development of the olfactory bulbs in NO females cannot thus be excluded. Indeed the present findings revealed an increase of plasma corticosterone in both sexes, although in 21-day-old males, this difference was only significant compared to untreated group. Moreover, the increased adrenal weight, which is in direct relationship with chronic stress exposure (Basset and West, 1997), was significantly more marked in females. Accordingly, we suggest that early olfactory deprivation by nasal obstruction at PND 8 induced a stress of which intensity was sex-dependent and that has persisted at least until PND 21. On the other hand, it should be noted that neither corticosterone level at PND 9, nor adrenal weight at PND 21 were increased in sham animals. Hence, we conclude that 24h after the treatment, the maternal separation linked to the procedure, the anesthesia by hypothermia and the burn administered on sham rats failed to involve a stress response. However, we cannot totally exclude the fact that the procedure interferes with some of our results by masking the effect of the nasal obstruction.

In agreement with our results, the literature consistently reported higher adrenal response for female pups compared to males after the induction of a chronic stress. For instance, it was shown that

the chronic maternal isolation involved a more important rise of plasma corticosterone level in female young than in male counterparts. Yoshimura et al. (2003) have proposed that this sex-specific regulation of adrenal responsiveness could be related to the absence or presence of testicular androgens even in the first weeks of life. This assumption is notably supported by the study of Gaskin and Kitay (1970) showing that pre-pubertal castration of male rats increased the adrenal hormone response to physical stress, a result that can be reversed by a single injection of testosterone.

Besides it would be necessary to underline the role that the maternal cares could play in the intersexual differences observed in the present investigation. Indeed it was shown that maternal rats spent more time licking the anogenital region of male than of female offspring (Moore and Morelli, 1979) and maternal licking appears to be particularly effective to maintain the level of corticosterone has a relatively low level during the post-natal development of rodents (Vazquez, 1998; Van Oers et al., 1999). In our study, the sex-dependent maternal licking could thus explain the fact that adrenal hypertrophy was greater in females and it would be certainly appropriate to evaluate the consequences of early nasal obstruction on infant—mother relationships in a future study.

Lastly, the present results revealed that the difference between the sexes in adrenal responsiveness was associated with immunological changes more significant in females. Thus, the thymus weight was statistically reduced only in females, maybe because the adrenal response was not sufficiently increased in the males to cause a significant fall of the thymus weight. Indeed it is well known that the thymus is particularly sensitive to stress-associated glucocorticoids, which induce thymocyte apoptosis (Tarcic et al., 1998; Dreau et al., 1999). Many authors observed the depressive impact of various kinds of stress on thymocyte proliferation at short-term (Groer et al., 2002) and long-term (Shanks et al., 2000). Our results demonstrated that in females, the thymus weight reduction was associated with a decrease of thymocyte proliferative response. In contrast, no effect on proliferative response of thymocyte has been observed in males probably due to the weaker adrenal activation. In females, the deleterious effect on proliferative response was statistically significant only with the mitogen ConA. Soppi (1981) has shown that the thymocyte response to mitogens was dependent on their maturation stage and that mature thymocytes cooperated better with the ConA than with the PHA. Additionally, flow

cytometry studies have shown that during the first weeks of life, rat pups exhibited changes in thymocyte subsets such as an increase of CD4<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> cells to the detriment of CD4<sup>-</sup> CD8<sup>-</sup> cells, which are less mature (Capri et al., 2000). Therefore, we can suppose that the cells affected by the early nasal obstruction would be rather thymocytes having reached a more important degree of maturity. The histological studies currently in progress at the laboratory will allow us to specify the cellular populations touched in the thymus under nasal obstruction. In any case, that could lead to a reduction of the heterogeneity of peripheral T-cells and have a negative impact on specific immunity of NO rats.

Lastly, early nasal obstruction did not have any effect on the splenic weight of both sexes. Most investigators failed to show an effect of stressors on spleen weight (Van Raaij et al., 1996; Dhabhar et al., 1997); in contrast to the suppressive effect of stress on the splenocyte proliferation that was extensively described. In particular, Groer et al. (2002) demonstrated that 3 h of daily maternal deprivation from PND 6 to 10 produced a decrease of splenocyte proliferative response to ConA at PND 15. Interestingly, this result could be reversed by a simulated maternal tactile stimulation; this once more underlines the role of maternal cares in the maintenance of homeostasis during the post-natal development. Our results demonstrated that early nasal obstruction was associated with a modification of splenocyte proliferative activity, for both mitogens in females and only with the ConA in males. A sympathetic activation after induction of nasal obstruction could explain the differences observed in males between the splenocyte response and the thymocyte response. Indeed the efferent portion of the stress response was generally described in terms of activation of the adrenal cortex as well as of the sympathetic nervous system. The sympathetic system is known to induce a release of catecholamines by the adrenal medulla. Xie et al. (2002) demonstrated that catecholamines inhibited the splenocyte proliferation and the production of IL-2, the most important T-cell growth factor. It would be thus interesting to investigate the catecholamine level and IL-2 production after induction of early nasal obstruction in order to clarify the mechanisms underlying the diminution of mitogen-induced proliferative activity of splenocytes.

In conclusion, our results revealed that compared to their male counterparts, female pups were more affected by nasal obstruction, which led to a stress response. This was related to an increased level of anxiety more marked in females. Furthermore, the

decrease of thymocyte proliferation observed only in females and the impairment of splenocyte proliferation observed in both sexes could be associated with a greater susceptibility to diseases in animals exposed to nasal obstruction. These data showed that early olfactory deprivation by nasal obstruction was related to some behavioral, endocrine and immunological alterations, which could have serious short and long-term consequences for the health and the social status of the individuals.

## Acknowledgments

We wish to thank Christiane Tankosic and Christian Vogel for their technical help in completion of the study. We thank also Dr. Frederic Suter and Dr. Jean-Pol Fripiat for helpful comments and suggestions.

## References

- Abreu-Villaca, Y., Queiroz-Gomes, F.D., Dal Monte, A.P., Filgueiras, C.C., Manhaes, A.C., 2006. Individual differences in novelty-seeking behavior but not in anxiety response to a new environment can predict nicotine consumption in adolescent C57BL/6 mice. *Behav. Brain Res.* 167, 175–182.
- Bardo, M.T., Donohew, R.L., Harrington, N.G., 1996. Psychobiology of novelty seeking and drug seeking behavior. *Behav. Brain Res.* 77, 23–43.
- Basset, J.R., West, S.H., 1997. Vascularization of adrenal cortex: its possible involvement of steroid hormone release. *Microscopy Res. Techn.* 36, 546–557.
- Bateman, A., Singh, A., Kral, T., Solomon, S., 1989. The immune-hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Endocr. Rev.* 10, 92–112.
- Brunjes, P.C., 1994. Unilateral naris closure and olfactory system development. *Brain Res. Brain Res. Rev.* 19, 146–160.
- Brunjes, P.C., Alberts, J.R., 1979. Olfactory stimulation induces filial preferences for huddling in rat pups. *J. Comp. Physiol. Psychol.* 93, 548–555.
- Brunjes, P.C., Smith-Crafts, L.K., McCarty, R., 1985. Unilateral odor deprivation: effects on the development of olfactory bulb catecholamines and behavior. *Brain Res.* 354, 1–6.
- Capri, M., Quaglino, D., Verzella, G., Monti, D., Bonafe, M., Cossarizza, A., Troiano, L., Zecca, L., Pasquali-Ronchetti, I., Franceschi, C., 2000. A cytofluorimetric study of T lymphocyte subsets in rat lymphoid tissues (thymus, lymph nodes) and peripheral blood: a continuous remodelling during the first year of life. *Exp. Gerontol.* 35, 613–625.
- Coopersmith, R., Leon, M., 1984. Enhanced neural response to familiar olfactory cues. *Science* 225, 849–851.
- Dhabhar, F.S., McEwen, B.S., Spencer, R.L., 1997. Adaptation to prolonged or repeated stress. Comparison between rat strains showing intrinsic differences in reactivity to acute stress. *Neuroendocrinology* 65, 360–368.
- Dreau, D., Sonnenfeld, G., Foxler, N., Morton, D.S., Lyte, M., 1999. Effects of social conflict on immune responses and *E. coli* growth within closed chambers in mice. *Physiol. Behav.* 67, 133–140.

- Exner, M., Clark, D., 1993. Behaviour in the novel environment predicts responsiveness to d-amphetamine in the rat: a multivariate approach. *Behav. Pharmacol.* 4, 47–56.
- Gaskin, J.H., Kitay, J.I., 1970. Adrenocortical function in the hamster. Sex differences and effects of gonadal hormones. *Endocrinology* 87, 779–786.
- Gelhaye, M., Martrette, J.M., Legrand-Frossi, C., Trabalon, M., 2006. Myosin heavy chain expression and muscle adaptation in rat. *Resp. Physiol. Neurobiol.* In Press.
- Groer, M.W., Hill, J., Wilkinson, J.E., Stuart, A., 2002. Effects of separation and separation with supplemental stroking in BALB/c infant mice. *Biol. Res. Nurs.* 3, 119–131.
- Hongo, T., Hakuba, A., Shiota, K., Naruse, I., 2000. Suckling dysfunction caused by defects in the olfactory system in genetic arhinencephaly mice. *Biol. Neonate* 78, 293–299.
- Knuth, E.D., Etgen, A.M., 2005. Corticosterone secretion induced by chronic isolation in neonatal rats is sexually dimorphic and accompanied by elevated ACTH. *Horm. Behav.* 47, 65–75.
- Marcilhac, A., Maurel, D., Anglade, G., Ixart, G., Mekouache, M., Hery, F., Siaud, P., 1997. Effects of bilateral olfactory bulbectomy on circadian rhythms of ACTH, corticosterone, motor activity and body temperature in male rats. *Arch. Physiol. Biochem.* 105, 552–559.
- Meisami, E., 1976. Effects of olfactory deprivation on post natal growth of the rat olfactory bulb utilizing a new method for production of neonatal unilateral anosmia. *Brain Res.* 107, 437–444.
- Moore, C.L., Morelli, G.A., 1979. Mother rats interact differently with male and female offspring. *J. Comp. Physiol. Psychol.* 93, 677–684.
- Nordeen, E.J., Nordeen, K.W., Sengelaub, D.R., Arnold, A.P., 1985. Androgens prevent normally occurring cell death in a sexually dimorphic spinal nucleus. *Science* 229, 671–673.
- Peretto, P., Giachino, C., Panzica, G.C., Fasolo, A., 2001. Sexually dimorphic neurogenesis is topographically matched with the anterior accessory olfactory bulb of the adult rat. *Cell. Tissue Res.* 306, 385–389.
- Rhees, R.W., Lephart, E.D., Eliason, D., 2001. Effects of maternal separation during early postnatal development on male sexual behavior and female reproductive function. *Behav. Brain Res.* 123, 1–10.
- Sczerzenie, V., Hsiao, S., 1977. Development of locomotion toward home nesting material in neonatal rats. *Dev. Psychobiol.* 10, 315–321.
- Seiden, A.M., Duncan, H.J., 2001. The diagnosis of a conductive olfactory loss. *Laryngoscope* 111, 9–14.
- Shanks, N., Windle, R.J., Perks, P.A., Harbuz, M.S., Jessop, D.S., Ingram, C.D., Lightman, S.L., 2000. Early-life exposure to endotoxin alters hypothalamic-pituitary-adrenal function and predisposition to inflammation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 97, 5645–5650.
- Simerly, R.B., 2005. Wired on hormones: endocrine regulation of hypothalamic development. *Curr. Opin. Neurobiol.* 15, 81–85.
- Song, B., Earley, B., Leonard, B.E., 1996. Behavioral and immunological effects of the antihistamine terfenadine in olfactory bulbectomized rats. *Eur. Neuropsychopharmacol.* 6, 157–162.
- Song, C., Leonard, B.E., 1993. Effect of thymopeptides on behaviour and some immunological response in olfactory bulbectomized rats. *Med. Sci. Res.* 20, 929–930.
- Song, C., Leonard, B.E., 1995. The effect of olfactory bulbectomy in the rat, alone or in combination with antidepressants and endogenous factors, on immune function. *Hum. Psychopharmacol.* 10, 7–18.
- Song, C., Leonard, B.E., 2005. The olfactory bulbectomized rat as a model of depression. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 29, 627–647.
- Soppi, E., 1981. The role of the maturation stage of thymocytes on the phytohemagglutinin and concanavalin A responses in thymocyte and lymph node lymphocyte cocultures in guinea pig. Effects of pre-treatment of thymocytes with thymosin or levamisole. *Immunopharmacology* 3, 83–91.
- Sullivan, R.M., 2003. Developing a sense of safety: the neurobiology of neonatal attachment. *Ann. NY Acad. Sci.* 1008, 122–131.
- Tarcic, N., Ovadia, H., Weiss, D.W., Weidenfeld, J., 1998. Restraint stress-induced thymic involution and cell apoptosis are dependent on endogenous glucocorticoids. *J. Neuroimmunol.* 82, 40–46.
- Van Den Hove, D.L., Steinbusch, H.W., Scheepens, A., Van De Berg, W.D., Kooiman, L.A., Boosten, B.J., Prickaerts, J., Blanco, C.E., 2006. Prenatal stress and neonatal rat brain development. *Neuroscience* 137, 145–155.
- Van Oers, H.J., De Kloet, E.R., Levine, S., 1999. Persistent effects of maternal deprivation on HPA regulation can be reversed by feeding and stroking, but not by dexamethasone. *J. Neuroendocrinol.* 11, 581–588.
- Van Raaij, M.T., Oortgiesen, M., Timmerman, H.H., Dobbe, C.J., Van Loveren, H., 1996. Time-dependent differential changes of immune function in rats exposed to chronic intermittent noise. *Physiol. Behav.* 60, 1527–1533.
- Vazquez, D.M., 1998. Stress and the developing limbic-hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Psychoneuroendocrinology* 23, 663–700.
- Waguespack, A.M., Reems, M.R., Butman, M.L., Cherry, J.A., Coppola, D.M., 2005. Naris occlusion alters olfactory marker protein immunoreactivity in olfactory epithelium. *Brain Res.* 1044, 1–7.
- Will, B., Toniolo, G., Kelche, C., Pallage, V., Deluzarche, F., Misslin, R., 1986. The effects of postoperative physical environment on novelty seeking behaviour and maze learning in rats with hippocampal lesions. *Behav. Brain Res.* 19, 233–240.
- Wills, T.A., Vaccaro, D., McNamara, G., 1994. Novelty seeking, risk taking and related constructs as predictors of adolescent substance use: an application of Cloninger's theory. *J. Subst. Abuse* 6, 1–20.
- Xie, Y., Frede, S., Harnish, M.J., Exton, M.S., Schedlowski, M., 2002. Beta-adrenoceptor-induced inhibition of rat splenocyte proliferation: cytokine gene transcription as the target of action. *Immunobiology* 206, 345–353.
- Yoshimura, S., Sakamoto, S., Kudo, H., Sassa, S., Kumai, A., Okamoto, R., 2003. Sex-differences in adrenocortical responsiveness during development in rats. *Steroids* 68, 439–445.

## Annexe 3



# Relations between maternal behavior and offspring's development under early nasal obstruction in rats.

Mathieu Gelhaye<sup>1</sup>, Marie Trabalon<sup>1</sup>, Jean-Marc Martrette<sup>1</sup>, Jean-Claude Mayer<sup>2</sup> and Christine Legrand-Frossi<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>*Physiologie du Comportement, IPHC, DEPE, UMR-CNRS 7178, UHP Nancy 1, BP 239, 54506 Vandœuvre-lès-Nancy, France.*

<sup>2</sup>*Service de Médecine Nucléaire, CHU Nancy-Brabois, 54511 Vandœuvre-lès-Nancy, France.*

\* *To whom correspondence should be addressed.*

Christine Legrand-Frossi

Physiologie du Comportement

Faculté des Sciences et Techniques

BP 239, 54506 Vandœuvre Cedex, France

(33) 03 83 68 42 62

E-mail: christine.legrand-frossi@scbiol.uhp-nancy.fr

**Running title:** early nasal obstruction and mother-young relationships.

## **Summary**

The aim of this study was to investigate the effects of a nasal obstruction (NO) on mother-young relationships, suckling behavior and hormonal status during post-natal development in rats. Therefore, we performed a bilateral nasal obstruction on eight-day old rats and we studied its effects at the beginning (postnatal day 9) and the end (postnatal day 15) of the nasal obstruction period. Our results revealed that NO animals exhibited a greater level of corticosterone at both ages and that the NO mothers perceived the distress of their young as suggested by the decreased duration of retrieving and the increased pup-licking. NO litters also exhibited a lower mean duration of the alimentary events and a decrease of the nipple attachment rate, which seemed related to difficulties to find the nipple. NO had indeed a functional impact on the olfactory abilities that disturbed the orientation to the nest. These behavioral modifications resulted in a diminution of the ingested milk quantity and a growth deceleration but were abrogated, even reversed, with the reopening of the nostrils. Lastly, NO was associated with a reduced level of thyroxin at both 9 and 15 days of age. These disturbances could explain the modifications of the peripheral physiological systems observed under nasal obstruction.

**Keywords:** Post-natal development, T-maze, Maternal behavior, Suckling behavior, Corticosterone, Thyroid hormones.

## 1. Introduction

Several ontogenic studies demonstrated the importance of early olfactory experiences in the neurobehavioral development of rodents (Coopersmith and Leon, 1984). In the rat neonate, olfactory cues from the mother and siblings are crucial in the establishment of early behaviors such as nursing (Hongo et al., 2000), huddling (Brunjes and Alberts, 1979) and home orientation (Sczerzenie and Hsiao, 1977). Newborn altricial mammals must learn the odor of their mother and use it to orient their displacements. As the mother is the sole source of food, warm and protection, learning this odor is critical for the survival of the newborn (Sullivan, 2003). For these different reasons, a chronic olfactory deficit can involve many consequences on the homeostasis of the young individual. In the last decade, many experimental studies were carried out requiring the induction of an early olfactory deprivation. A common technique employed to produce transient olfactory deprivation in neonatal animals consists in the obstruction of the nasal cavities (Meisami, 1976; Waguespack et al. 2005). This procedure generates numerous effects on the olfactory bulb, including reduction of its volume and a variety of physiological and biochemical alterations (Brunjes et al., 1985; Brunjes, 1994). However, the functional impacts of nasal obstruction on olfactory abilities were never investigated.

Our previous studies revealed besides that nasal obstruction induced in eight-day old rats was associated with an impairment of novelty-seeking behavior, an adrenal hypertrophy and an increase in circulating glucocorticoids at 21 days of age (Gelhaye et al., 2006a). These modifications were associated with a decrease of splenocyte and thymocyte proliferative responses and with an adaptation of orofacial muscles, facilitating respiration (Gelhaye et al., 2006a, 2006b). Consequently we concluded that early nasal obstruction could be regarded as a multi-factorial stressful situation, which ultimately affected the peripheral physiological systems. These effects could be explained, at least partially, by a disturbance of mother-young relationships, which would affect the endocrine balance. In rodents, there is indeed a reciprocal regulation of responsiveness to stress between mother and offspring (for review, see Walker et al., 2004). For example dietary influences are critical in the modulation of the stress response and it was shown that olfactory signals were essential in the orientation to the nipples in several species of rodents (Blass and Teicher, 1980; Gerling and Yahr, 1982; Coureaud and Schaal, 2000). By reducing the olfactory abilities, early nasal obstruction could

thus have important functional repercussions on mother-young relationships and notably on the offspring's suckling behavior.

It is well known that both the quantity and the quality of the ingested food play a crucial part in the maintenance of hormonal homeostasis during the postnatal period. A mother-milk deprivation of few hours induced for instance a significant reduction of thyroxin levels and an increase of plasma corticosterone levels (Oberkotter, 1988; Schmidt et al., 2002). Both thyroid hormones and corticosterone play a key role in the normal development of mammals. For example a neonatal thyroid hormone deficiency disturbs brain development, suppresses the proliferation of lymphocytes B precursors and delays the maturation of orofacial muscles (Arpin et al., 2000; Koibuchi and Chin, 2000; Ganji and Behzadi, 2007). For that reason, the fundamental assumption of the experimental work presented in this study is that the effects of nasal obstruction on peripheral physiological systems could be linked, at least partially, to a disturbance of mother-young relationships, which would generate alterations on the corticotrope and thyroid axes.

Consequently, the aim of the present investigation was to evaluate the effect of a nasal obstruction on mother-young relationships during post-natal development in rats. We proposed to perform a bilateral nasal obstruction on eight-day old rats and to study its effects on behavior at the beginning (postnatal day 9) and the end (postnatal day 15) of the nasal obstruction period. Hence, the first intend of this study was to explore the consequences of early nasal obstruction on some parameters of mother-young relationships, focusing more particularly on suckling behavior. The second aim was then to assess the functional impacts of early nasal obstruction on olfactory abilities. The nest recognition was therefore investigated in a two-choice situation. Lastly, the effects of nasal obstruction on corticosterone, thyroxin (T4) and triiodothyronin (T3) levels were studied in 9 and 15-day old rats of both sexes.

## **2. Methods**

### **2.1. Animal care**

Forty mixed-sex litters (Wistar, iops IFFA-CREDO) from post-natal day (PND) 8 to 15 were used. These animals were born in the laboratory and housed in standard cages under controlled temperature conditions ( $22 \pm 1^\circ\text{C}$ ). Food and water were available *ad libitum* during the whole

experiment. From the birth, the litters were kept on a reversed 12:12 light-dark cycle (dark period 0800h - 2000h) and were culled to five males and five females to ensure normal body growth.

## **2.2. Nasal obstruction procedure**

All experimental procedures were conforming to the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals published by the National Institutes of Health (n° 85-23, revised 1996) and the recommendations edited by the European Community Council for the Ethical Treatment of Animals (n° 86/609/EEC). All efforts were made to minimize animal suffering.

At PND 8, the litters were randomly divided into three experimental groups. Untreated group (UT) was defined by the complete absence of manipulation. Sham group (SH) and animals with nasal obstruction (NO) were first anesthetized by hypothermia (10 min at -18°C). Once the litters were anesthetized, a bilateral nasal obstruction was performed on NO animals as previously described by Meisami (1976). The selected method consists in the cauterization of the external nostrils, which is the most common and simple procedure allowing reversible nasal obstruction in growing animals. The tissue surrounding the nostrils was burned by placing a surgical cauterizing instrument on the nostrils, consequently occluding the orifice of the nostrils. In the days following the treatment, the reopening of the nostrils was assessed by applying a soapy solution; the absence of bubbles was used as an indicator of complete occlusion. The procedure induced a complete nasal obstruction between PND 8 and PND 14 with 100% of the nostrils reopened at PND 16. Consequently, the different experiments were conducted at PND 9, i.e. 24h after the induction of the nasal obstruction, and at PND 15, age corresponding to the end of the nasal obstruction period. In sham group, the nostrils were not sealed but the tissue above them was burned by placing the cauterizing instrument about 1-2 mm above each nostril. After the cauterization, the burn was washed with chlortetracyclin (Aureomycin Evans 3%) to prevent a possible infection. SH and NO animals were kept warm (37°C) for half an hour and they were then returned to their mothers.

In order to avoid interferences between different experiments, the litters were randomly divided into animals used to test the mother-young relationships ( $n = 5$  mothers per group), animals used to test the growth parameters and the olfactory abilities ( $n = 15$  rats per sex and per group) and animals used for the gastric content and hormonal assays ( $n = 8$  rats per sex, per age and per group).

## 2.3. Behavioral analysis

### 2.3.1. Mother-young relationships

All behavioral observations were made during the dark phase between 0900h and 1200h. The different apparatus were maintained in the same position in the room throughout the duration of the study. During the last week of gestation, the mothers were placed in home cages (65 x 32 x 50 cm) conceived to facilitate the behavioral observations. The front wall was made of transparent Plexiglas and the three other walls were made in gray PVC. The ground (0.2 m<sup>2</sup>) was covered by 100 ± 10 g of clean sawdust. Food and water were available *ad libitum* during the whole experiment. Five mothers per group were used to test the maternal and suckling behaviors. The maternal behavior was only examined at PND 9. Indeed, with the neurobehavioral maturation of the offspring (emergence of hearing, quadruped walk, vision, thermoregulation, autonomous urination...); the expression of maternal behavior gradually decreases during the postnatal period.

At PND 9 and 15, the mother was removed from the home cage for a period of 2h (0900h - 1100h) before starting the behavioral observations (Stern and Johnson, 1990; Stern and Azzara, 2002). This maternal deprivation was performed in order to exacerbate the maternal behavior and the enticement for the nipples. At 1100h, the litters were temporarily culled to six rats (three females and three males) to avoid the competition and to facilitate the access to the nipples (Arrati et al., 2005). The removed animals were maintained in presence of nest sawdust and their anogenital region was stroked periodically to limit the effects of the additional maternal deprivation (Van Oers et al., 1999). The animals used for the behavioral analysis were placed in the opposite side from the site where the mother built the nest. The mother was then returned to the home cage.

During the next 60 min (1100h - 1200h), the following behavioral items were recorded: the duration of pup-retrieval (when the mother picks up the pups in her mouth and places them in the nest), the duration of pup-licking (when the female licks the body and/or the anogenital region of the pups) and the duration of presence in the nest (when the mother is in the nest, her body over all or most pups) were only recorded at PND 9. In addition, the latency of the first alimentary event (when the mother adopts a nursing posture with at least one pup attached to the nipples), the duration of

alimentary events and the maximum rate of nipple attachment (maximum number of simultaneously suckling rats) were recorded at PND 9 and PND 15.

### **2.3.2. Two-choice situation: return to the nest**

In order to evaluate their olfactory abilities, the rats were observed at PND 9 and PND 15 in the two-choice situation “nest sawdust versus clean sawdust”. This test was performed in a T-maze with a start arm connected to two goal arms of equal dimensions. The maze was constructed of Plexiglas, with a guillotine door separating the start box from the main stem of the maze. An experimental box (30 x 18 x 14 cm) was situated at the end of each goal arm and was separated of them by a punched door which allowed stimulation by smell. Two arm sizes were used in order to adapt the test to the rat’s growth (PND 9: 10 x 6 x 6 cm; PND 15: 25 x 8 x 8 cm). In all cases,  $45 \pm 5$  g of sawdust were placed in the experimental boxes and the nest sawdust was randomly placed in the right or left experimental box. The observation period (3 min) began when the rat penetrated in the start arm of the T-maze; the guillotine door was then closed.

The percentage of rats carrying out a choice, the latency of the first choice (defined by the first contact between an animal and a lateral box), the side of the first choice and the time spent in each arm of the T-maze were recorded. After the behavioral observations, animals were weighed and their length was measured from the nose to the base of the tail. The ponderal and longitudinal gains of each individual were calculated over the period PND 9 - PND 15.

### **2.4. Samples collection**

At PND 9 or PND 15, immediately following sacrifice, intra-cardiac blood samplings (500 - 1000  $\mu$ l) were performed between 1100h and 1200h for corticosterone, thyroxin and triiodothyronin measurements. Blood was collected within 1-2 min into sterile heparinized syringes fitted with a 26-G needle. Plasma was immediately separated from cells by centrifugation at 4°C (15 min at 3000 rpm)

then the extracts were stored at -18°C until the time of the assay. After blood sampling, the gastric content, which constitutes a reliable index of the quantity of ingested milk (Fukushima et al., 2004), was removed and weighed.

## **2.5. Hormonal analysis**

In order to assess the adrenal response after the induction of early nasal obstruction, the corticosterone concentration was measured without extraction procedure, using a commercially available EIA kit and according to the manufacturer's guidelines (Assay Designs Inc., USA). The concentration of corticosterone in plasma samples was calculated from a standard curve and expressed as ng/ml. The intra- and inter-assay coefficients of variation were under 8.4 and 13.1 %, respectively. T4 and T3 were assayed using commercial RIA kits according to the manufacturer's guidelines (Immunotech SA, France). The concentrations of T4 and T3 in plasma samples were calculated from standard curves and expressed as pg/ml. The intra- and inter-assay coefficients of variation were respectively under 6.7 and 6.5 % for T4 and under 6.4 and 5.5 % for T3.

## **2.6. Data analysis**

Data were expressed as group means  $\pm$  SE. Statistical analysis was performed by means of statistical software (Statview V5.0, Abacus concepts Inc., Berkeley, CA). Concerning the behavioral data, the mother-young relationships were examined using the Kruskal-Wallis analysis of variance. The U-test of Mann-Whitney was used to establish the inter-group comparison. The two-choice situation was analyzed with the chi-square's test for the percentage of rats carrying out a choice and the side of the first choice or with a two-way analysis of variance (sex \* treatment) for the latency of the first choice and the time spent in each arm of the T-maze. In this last case, the PLSD Fisher procedure was used to establish the inter-group comparison. Concerning the physiological data, after a two-way analysis of variance (sex \* treatment), the PLSD Fisher procedure was used to establish the inter-group comparison. In all cases, the differences were considered significant at  $p < 0.05$ .

## **3. Results**

### 3.1. Behavioral analysis

#### 3.1.1. Maternal behavior

As shown in figure 1, the maternal behavior was affected by the experimental treatments. There was indeed a significant difference for the duration of pup-retrieval ( $H = 8.64$ ,  $p = 0.013$ ) and the duration of pup-licking ( $H = 8.18$ ,  $p = 0.017$ ), whereas the presence in the nest was comparable among the experimental groups ( $H = 0.56$ ,  $p = 0.756$ ). At PND 9, the mothers of the litters exposed to nasal obstruction spent less time to bring back the young to the nest compared to untreated ( $p = 0.009$ ) and sham mothers ( $p = 0.016$ ). In addition, the duration of pup-licking was increase in the litters exposed to nasal obstruction compared to untreated ( $p = 0.009$ ) and sham litters ( $p = 0.028$ ). Besides there was no significant difference between untreated and sham groups ( $p = 0.917$  for pup-retrieval;  $p = 0.602$  for pup-licking).

#### 3.1.2. Suckling behavior

Figure 2 shows that the suckling behavior was affected by the experimental treatments. At PND 9, there was indeed a significant difference for the latency of the first alimentary event ( $H = 6.62$ ,  $p = 0.037$ ), the mean duration of the alimentary events ( $H = 10.09$ ,  $p = 0.006$ ) and the rate of nipple attachment ( $H = 14.73$ ,  $p = 0.0006$ ). The latency of the first alimentary event was indeed higher in the litters exposed to nasal obstruction compared to untreated and sham litters ( $p = 0.028$  in both cases). On the other hand, the mean duration of alimentary events and the rate of nipple attachment were reduced in the litters exposed to nasal obstruction compared to untreated ( $p = 0.007$  for the mean duration;  $p = 0.002$  for the nipple attachment) and sham litters ( $p = 0.01$  for the mean duration;  $p = 0.002$  for the nipple attachment). These differences were abrogated at PND 15 ( $H = 0.56$ ,  $p = 0.756$  for the latency;  $H = 5.43$ ,  $p = 0.066$  for the mean duration;  $H = 2.21$ ,  $p = 0.332$  for the nipple attachment); although at this age the total duration of alimentary events was affected by the experimental treatments ( $H = 6.66$ ,  $p = 0.036$ ). Indeed the total duration of alimentary events was higher at PND 15 in the litters exposed to nasal obstruction compared to untreated ( $p = 0.016$ ) and

sham litters ( $p = 0.047$ ). At last, for all the studied ages and parameters, there was no significant difference between untreated and sham groups ( $0.602 < p < 0.999$ ).

### 3.1.3. Return to the nest

When tested for their reactions in the two-choice situation “nest sawdust versus clean sawdust” (figure 3 and 4), a significant difference was measured at PND 9 for the percentage of rats carrying out a choice ( $3.88 < \chi^2 < 10.41$ ,  $0.001 < p < 0.048$ ), for the return rate to the nest ( $4.47 < \chi^2 < 5.32$ ,  $0.021 < p < 0.034$ ), for the latency of the first choice ( $F = 7.56$ ,  $p < 0.0001$ ) and for the time spent in each arm of the T-maze ( $F = 9.58$ ,  $p < 0.0001$  for nest sawdust;  $F = 3.27$ ,  $p = 0.011$  for center arm;  $F = 4.02$ ,  $p = 0.003$  for clean sawdust). Some of these differences were abrogated at PND 15. At this age, there was indeed no more significant difference for the percentage of rats carrying out a choice ( $0.002 < \chi^2 < 1.60$ ,  $0.206 < p < 0.965$ ) and the latency of the first choice ( $F = 1.93$ ,  $p = 0.101$ ); whereas the return rate to the nest ( $0.31 < \chi^2 < 5.56$ ,  $0.018 < p < 0.580$ ) and the time spent in the nest side ( $F = 4.48$ ,  $p = 0.001$ ) remained significantly different.

At PND 9, animals exposed to nasal obstruction carried out less choice than untreated ( $\chi^2 = 3.88$ ,  $p = 0.048$  in females;  $\chi^2 = 5.96$ ,  $p = 0.015$  in males) and sham animals ( $\chi^2 = 5.17$ ,  $p = 0.023$  in females;  $\chi^2 = 10.41$ ,  $p = 0.001$  in males). Furthermore, NO animals exhibited a decreased rate of return to the nest in both females ( $\chi^2 = 5.32$ ,  $p = 0.021$  versus untreated and sham) and males ( $\chi^2 = 4.47$ ,  $p = 0.034$  versus untreated;  $\chi^2 = 4.85$ ,  $p = 0.028$  versus sham). These animals showed also a greater latency of the first choice compared to untreated ( $p = 0.0002$  in females;  $p = 0.006$  in males) and sham animals ( $p = 0.0006$  in females;  $p = 0.001$  in males). At last, animals exposed to nasal obstruction spent less time on the nest side ( $p < 0.0001$  in all cases) to the advantage of the clean sawdust side (females:  $p = 0.003$  versus untreated and sham; males:  $p = 0.010$  versus untreated,  $p = 0.009$  versus sham) and of the center arm side (females:  $p = 0.046$  versus untreated,  $p = 0.023$  versus sham; males:  $p = 0.008$  versus untreated,  $p = 0.003$  versus sham). NO animals presented a time distribution close to a random distribution (about 33 % of time in each arm of the maze).

At PND 15, the males exposed to nasal obstruction still showed a lower rate of return to the nest compared to sham males only ( $\chi^2 = 1.25$ ,  $p = 0.264$  versus untreated;  $\chi^2 = 5.56$ ,  $p = 0.018$  versus sham), whereas there was no more significant difference in females ( $\chi^2 = 0.50$ ,  $p = 0.481$  versus

untreated;  $\chi^2 = 0.31$ ,  $p = 0.580$  versus sham). The time spent on the nest side remained inferior in NO females compared to UT ( $p = 0.010$ ) and SH females ( $p = 0.0004$ ) and in NO males compared to SH males only ( $p = 0.159$  versus untreated;  $p = 0.003$  versus sham). Nevertheless, that did not result any more in significant differences on the time spent in the clean sawdust side ( $F = 2.32$ ,  $p = 0.051$ ) and in the center arm ( $F = 2.11$ ,  $p = 0.073$ ). At last, for all the studied parameters, there never was significant difference between untreated and sham animals ( $0.099 < p < 0.999$ ).

### 3.2. Growth parameters

As shown in table 1, there was no significant difference for body weight at PND 9 between the experimental groups in both sexes ( $F = 1.54$ ,  $p = 0.188$ ). In contrast, a significant difference was detected at PND 15 ( $F = 8.80$ ,  $p < 0.0001$ ). Animals exposed to nasal obstruction present indeed a lower body weight at PND 15 in both females ( $p = 0.0004$  versus untreated,  $p = 0.002$  versus sham) and males ( $p < 0.0001$  versus untreated and sham). Compared to untreated group, the reduction percentage was of 20 % in females and of 24 % in males. The experimental treatments also affected the ponderal gain over the period PND 9 - PND 15 ( $F = 8.80$ ,  $p < 0.0001$ ), which was reduced under nasal obstruction in both females ( $p < 0.0001$  versus untreated,  $p = 0.0004$  versus sham) and males ( $p = 0.0001$  versus untreated,  $p = 0.0002$  versus sham). Compared to untreated group, the reduction percentage was of 52 % in females and of 61 % in males. Besides, there was no significant difference between untreated and sham animals ( $p = 0.597$  in females,  $p = 0.921$  in males).

Table 1 shows also that the experimental groups exhibited different body lengths at both PND 9 ( $F = 3.25$ ,  $p = 0.011$ ) and PND 15 ( $F = 19.12$ ,  $p < 0.0001$ ). Females exposed to nasal obstruction presented indeed a lower body length at PND 9 compared to untreated females only ( $p = 0.012$  versus untreated;  $p = 0.375$  versus sham). In males, the nine-day old NO animals showed a reduced body length compared to untreated and sham animals ( $p = 0.017$  versus untreated;  $p = 0.007$  versus sham). These differences tended to be accentuated at PND 15 in both females and males ( $p < 0.0001$  versus untreated and sham in all cases). At this age, the body length was reduced of 9 % in females and of 10 % in males compared to untreated animals. The experimental treatments affected also the longitudinal gain over the period PND 9 - PND 15 ( $F = 4.48$ ,  $p = 0.001$ ). Indeed the longitudinal gain was reduced under nasal obstruction in both females ( $p = 0.021$  versus untreated,  $p = 0.005$  versus

sham) and males ( $p = 0.009$  versus untreated,  $p = 0.003$  versus sham). Compared to untreated group, the reduction percentage was of 35 % in females and of 37 % in males. At last, there was no significant difference between untreated and sham animals ( $p = 0.808$  in females,  $p = 0.897$  in males).

### 3.3. Gastric content

As shown in figure 5, the specific weight of gastric content was affected by the experimental treatments at PND 9 ( $F = 9.71$ ;  $p < 0.0001$ ) and PND 15 ( $F = 3.18$ ;  $p = 0.016$ ). At PND 9, animals exposed to nasal obstruction exhibited a decrease of gastric content weight in both females ( $p = 0.0005$  versus untreated;  $p = 0.004$  versus sham) and males ( $p < 0.0001$  versus untreated;  $p = 0.0002$  versus sham). Compared to untreated animals, the reduction percentage was of 59 % in females ( $10.8 \pm 2.2$  mg/g versus  $26.0 \pm 2.7$  mg/g) and of 64 % in males ( $10.9 \pm 3.1$  mg/g versus  $29.9 \pm 3.3$  mg/g). At PND 15, this difference tended to be reversed. Indeed specific weight of gastric content was significantly higher at PND 15 in males exposed to nasal obstruction (+ 31% and  $p = 0.026$  versus untreated; + 38% and  $p = 0.003$  versus sham), although no significant difference was detected in females ( $p = 0.074$  versus untreated;  $p = 0.061$  versus sham). Finally, whatever the age and the sex considered, there was no significant difference between untreated and sham animals ( $0.226 < p < 0.930$ ).

### 3.4. Hormonal analysis

#### 3.4.1. Corticosterone assay

As shown in figure 6, plasma corticosterone levels were significantly different between the experimental groups at PND 9 ( $F = 8.63$ ,  $p < 0.0001$ ) and PND 15 ( $F = 10.30$ ,  $p < 0.0001$ ). 24h after the treatment, the nasal obstruction was associated with an augmentation of corticosterone concentration in both sexes (females:  $p = 0.0003$  versus untreated and sham; males:  $p = 0.0001$  versus untreated,  $p = 0.0004$  versus sham). At PND 15, the plasma corticosterone level remained significantly higher in NO females ( $149.5 \pm 20.8$  ng/ml) compared to untreated ( $44.2 \pm 8.1$  ng/ml,  $p < 0.0001$ ) and sham females ( $32.3 \pm 2.9$  ng/ml,  $p < 0.0001$ ). The plasma corticosterone level was also

significantly increased in NO males ( $109.0 \pm 24.6$  ng/ml) compared to untreated males ( $51.0 \pm 8.7$  ng/ml,  $p = 0.01$ ) and sham males ( $39.5 \pm 6.3$  ng/ml,  $p = 0.003$ ). At last, the values of plasma corticosterone were comparable between untreated and sham animals in both sexes at the two tested ages (PND 9:  $p = 0.989$  in females,  $p = 0.742$  in males; PND 15:  $p = 0.683$  in females;  $p = 0.617$  in males).

### 3.4.2. Thyroid hormone assays

Figure 7A shows that plasma thyroxin levels were significantly different between the experimental groups at PND 9 ( $F = 20.27$ ,  $p < 0.0001$ ) and PND 15 ( $F = 6.53$ ,  $p = 0.0002$ ). 24h after the treatment, the thyroxin concentration was significantly reduced in sham females compared to untreated females ( $p = 0.01$ ). The same tendency was observed in sham males although the difference compared to untreated males was not significant ( $p = 0.059$ ). Moreover, the females exposed to nasal obstruction exhibited a significant decrease of thyroxin level compared to untreated and sham females, but also compared to their male counterparts ( $p < 0.0001$  in all cases). In the nine-day old NO males, a significant decrease of thyroxin concentration was detected compared to untreated males only ( $p = 0.009$  versus untreated;  $p = 0.433$  versus sham). At PND 15, there was no more significant difference between untreated and sham animals ( $p = 0.075$  in females;  $p = 0.341$  in males). In contrast, animals exposed to nasal obstruction showed a significant decrease of plasma thyroxin level in both females ( $p = 0.0002$  versus untreated;  $p = 0.030$  versus sham) and males ( $p = 0.008$  versus untreated;  $p = 0.0005$  versus sham).

As shown in figure 7B, plasma triiodothyronin levels were significantly different between the experimental groups at PND 9 ( $F = 10.65$ ;  $p < 0.0001$ ) and PND 15 ( $F = 2.58$ ;  $p = 0.040$ ). Contrary to what was observed for thyroxin, the triiodothyronin concentration was significantly increased at PND 9 in sham animals compared to untreated animals ( $p = 0.007$  in females;  $p = 0.001$  in males). At this age, the individuals exposed to nasal obstruction exhibited a significant diminution of triiodothyronin level compared to sham animals ( $p = 0.0003$  in females;  $p < 0.0001$  in males), whereas there was no significant difference compared to untreated animals ( $p = 0.264$  in females;  $p = 0.061$  in males). At PND 15, the triiodothyronine concentration remained lower in females exposed to nasal obstruction

compared to sham females only ( $p = 0.192$  versus untreated;  $p = 0.003$  versus sham). There was no more significant difference between the males ( $0.141 < p < 0.692$ ).

#### 4. Discussion

Our results revealed that the NO mothers exhibited a decreased duration of pup-retrieval and an increased duration of pup-licking. Since early nasal obstruction was associated with an increase of circulating corticosterone at both PND 9 and PND 15, we hypothesized that the NO mothers probably perceived the distress of their young via acoustic and/or chemical signals. Indeed it is well known that in distress situations, rodents emit vocalizations and chemical signals which can be selectively recognized by recipients (Hofer and Shair, 1992; Ma et al., 1998). For example, vocalizations in the ultrasonic range have been reported to occur in young rodents moved away from the nest (Hahn and Lavooy, 2005). The pup isolation calls elicit searching and retrieval behaviors by the mother (Brewster and Leon, 1980) and the number of calls can modify the mother's behavior (Brudzynski, 2005). As a high level of anxiety is known to enhance the rate of ultrasonic vocalizations (Naito et al., 2000), a higher level of vocalization could explain the lower duration of pup-retrieval observed in the NO litters. On the other hand, our results showed that the duration of pup-licking was greater in the NO litters what could also be related to the calls coming from the offspring. Indeed the isolation calls contribute to an increase in anogenital licking by the mother following retrieval (Brouette-Lahlou et al., 1992). The majority of total licking time is spent licking the pup's anogenital region, behavior that stimulates reflexive defecation and urination (Moore, 1982). In addition to the influence of acoustic signals, anogenital licking is also strongly related to a pheromone present in the urine of the offspring (Brouette-Lahlou et al., 1999). We can thus suppose that the NO mothers could perceive the distress of their young via for example adrenal-mediated urinary metabolites, and consequently increased the licking duration. Nevertheless, further investigations are necessary to clarify the nature of the sensory signals with which the mother perceived the distress of her young.

Our results also revealed that suckling behavior was affected by the nasal obstruction. At PND 9, the NO litters exhibited indeed a greater latency of the first alimentary event, a lower mean duration of the alimentary events and a decrease of the nipple attachment rate. Theses modifications result in a diminution of the ingested milk quantity and a growth deceleration. The food intake was however

restored, even reversed, with the reopening of the nostrils. NO animals presented then an increased total duration of the alimentary events and a higher quantity of ingested milk. It is well documented that olfaction plays a central part in the expression of suckling behavior and notably in the young rat, in which the orientation to the nipples is pheromone-dependent (Blass and Teicher, 1980). On the other hand, it was shown that the establishment of the nursing posture and the milk ejection were dependent on the combined suckling stimuli of several pups (Stern and Johnson, 1990). Since the NO mothers were present at the nest and correctly cared their pups, we conclude that the decreased food intake was rather related to the olfactory deprivation and to the associated difficulties to find the nipples. This assumption is notably supported by the lower rate of nipple attachment observed in the litters exposed to nasal obstruction. In addition, during the alimentary events, nasal obstruction involves a competition between the respiratory and alimentary processes (Kalogjera et al., 1991). The respiratory disturbances so could represent a factor worsening the impacts of nasal obstruction on the food intake.

The assumption that the decrease of food intake was, at least partially, related to difficulties to find the nipples is also supported by the results concerning the olfactory abilities. Our results showed indeed that nasal obstruction had a functional impact on the olfactory abilities that disturbed the orientation to the nest 24h after the treatment. The nine-day old NO animals exhibited a lower rate of return to the nest and randomly distributed their time in the three arms of the maze. NO animals performed also less choice and presented an elevated latency of the first choice suggesting a perturbation of the exploratory behavior. These impairments could be explained by both a lack of olfaction and, as shown in our previous investigation (Gelhaye et al., 2006a), by an increased level of anxiety. Olfactory deprivation and exacerbated anxiety could indeed act together on the exploratory behavior. Besides, the differences observed for the number of choice and the latency of the first choice were totally abrogated at PND 15, whereas the return rate to the nest and the time spent in the nest side remained significantly different. These data suggest a fast recovery to a basal level of exploratory behavior and a slower functional recovery of the olfactory abilities despite the nostrils reopening. This could be explained by the fact that with the appearance of hearing and vision (approximately at PND 10 and PND 14, respectively), the relative role of olfaction in the expression of exploratory behavior decreases gradually. On the other hand, nasal obstruction produces an atrophy of the olfactory system's components demonstrated for both the olfactory bulb and the olfactory

mucosa (Stahl et al., 1990; Brunjes, 1994). Mirich and Brunjes (2001) showed in particular that after the induction of a nasal obstruction, the return to a normal breathing induced a restoration of the olfactory mucosa depth within a few days. This recovery time could explain the delay in the functional recovery of the olfactory abilities, although the external nostrils were reopened.

In order to know the impacts of the nutritional disturbances on the thyroid axis, T3 and T4 levels were assayed. Nutritional depletion is indeed known to impair the maintenance of hormonal homeostasis during the postnatal period (Oberkotter, 1988; Schmidt et al., 2002). First, nine-day old SH individuals presented an increase of T3 level to the detriment of T4. Hence we conclude that the maternal separation linked to the procedure, the anesthesia by hypothermia and the burn administered on sham rats impaired the thyroid functions. This effect was however time-limited since no more difference was detected at PND 15. The opposed impacts on the T3 and T4 concentrations suggested a modification in the peripheral metabolism of the thyroid hormones. T3 is the most active thyroid hormone from a metabolic point of view (Kohrle, 1996). It can be synthesized by the thyroid gland but is mainly generated in the peripheral tissues by conversion of T4 (Kelly, 2000). Different factors are known to exacerbate the peripheral conversion of T4 among which the cold exposure. This one involves indeed an activation of the sympathetic nervous system which, through an increase in the catecholamine secretion, accelerates the intracellular conversion of T4 (Silva and Larsen, 1983; Bianco et al., 2005). By this intermediary, the procedure accompanying the nasal obstruction could so increase the peripheral conversion of T4. Second, NO animals exhibited a reduction of T4 levels at both PND 9 and PND 15. The T3 concentrations were only different compared to sham animals suggesting an additional mechanism with the modifications of peripheral metabolism. Diano et al. (1998) and Kasdallah et al. (2005) have shown that nutritional deprivation had a suppressive impact on the T4 and T3 concentrations. However, our results failed to show a significant reduction of T3 levels in animals exposed to nasal obstruction. This could be explained by a masking effect of the procedure accompanying the nasal obstruction. The nasal obstruction itself and the associated procedure would thus have synergistic effects on the T4 level and antagonist effects on the T3 level. At last, the present investigation showed that the decrease of T4 concentration was more pronounced in the females exposed to nasal obstruction. In basal or stressful conditions, the levels of T4 are generally higher in adult males due to the presence of testosterone (Christianson et al., 1981; Waner

and Nyska, 1988; Kobal et al., 2000). It would be thus interesting to perform an exogenic administration of testosterone in order to clarify the mechanisms underlying the lower level of T4 observed in females exposed to early nasal obstruction.

In conclusion, early nasal obstruction disturbed mother-young relationships and decreased the offspring's food intake. These behavioral changes were associated with an increase of corticosterone level and a decrease of T4 level, which was more marked in females. This study suggested that the effects of early nasal obstruction on the peripheral physiological systems could be partly linked to a disturbance of mother-young relationships and notably of food intake. Via hormonal modifications, the impairment of food intake could thus explain the structural changes of orofacial muscles and the reduction of the lymphocyte proliferation observed under nasal obstruction. Our previous study showed furthermore that the behavioral, endocrine and immunologic impacts of nasal obstruction were more marked in females than in males at PND 21. Except for the T4 level, these sex-dependant changes are less obvious in the present study and could thus appear rather during the recovery time after the nostrils reopening. In all cases, it would be certainly interesting to assess the testosterone levels in order to clarify the mechanisms underlying the sex-difference observed under early nasal obstruction.

## References

- Ahima, R.S., Prabakaran, D., Mantzoros, C., Qu, D., Lowell, B., Maratos-Flier, E., Flier, J.S., 1996. Role of leptin in the neuroendocrine response to fasting. *Nature* 382, 250-252.
- Arpin, C., Pihlgren, M., Fraichard, A., Aubert, D., Samarut, J., Chassande, O., Marvel, J., 2000. Effects of T3R alpha 1 and T3R alpha 2 gene deletion on T and B lymphocyte development. *J. Immunol.* 164, 152-160.
- Arrati, P.G., Carmona, C., Dominguez, G., Beyer, C., Rosenblatt, J.S., 2005. GABA receptor agonists in the medial preoptic area and maternal behavior in lactating rats. *Physiol. Behav.* 87, 51-65.
- Bianco, A.C., Maia, A.L., da Silva, W.S., Christoffolete, M.A., 2005. Adaptive activation of thyroid hormone and energy expenditure. *Biosci. Rep.* 25, 191-208.
- Blass, E.M., Teicher, M.H., 1980. Suckling. *Science* 210, 15-22.
- Brewster, J., Leon, M., 1980. Relocation of the site of mother-young contact: maternal transport behavior in Norway rats. *J. Comp. Physiol. Psychol.* 94, 69-79.
- Brouette-Lahlou, I., Godinot, F., Vernet-Maury, E., 1999. The mother rat's vomeronasal organ is involved in detection of dodecyl propionate, the pup's preputial gland pheromone. *Physiol. Behav.* 66, 427-436.
- Brouette-Lahlou, I., Vernet-Maury, E., Vigouroux, M., 1992. Role of pups' ultrasonic calls in a particular maternal behavior in Wistar rat: pups' anogenital licking. *Behav. Brain Res.* 50, 147-154.
- Brudzynski, S.M., 2005. Principles of rat communication: quantitative parameters of ultrasonic calls in rats. *Behav. Genet.* 35, 85-92.
- Brunjes, P.C., 1994. Unilateral naris closure and olfactory system development. *Brain Res. Brain Res. Rev.* 19, 146-160.
- Brunjes, P.C., Alberts, J.R., 1979. Olfactory stimulation induces filial preferences for huddling in rat pups. *J. Comp. Physiol. Psychol.* 93, 548-555.
- Brunjes, P.C., Smith-Crafts, L.K., McCarty, R., 1985. Unilateral odor deprivation: effects on the development of olfactory bulb catecholamines and behavior. *Brain Res.* 354, 1-6.
- Christianson, D., Roti, E., Vagenakis, A.G., Braverman, L.E., 1981. The sex-related difference in serum thyrotropin concentration is androgen mediated. *Endocrinology* 108, 529-535.

- Coopersmith, R., Leon, M., 1984. Enhanced neural response to familiar olfactory signals. *Science* 225, 849-851.
- Coureaud, G., Schaal, B., 2000. Attraction of newborn rabbits to abdominal odors of adult conspecifics differing in sex and physiological state. *Dev. Psychobiol.* 36, 271-281.
- Diano, S., Naftolin, F., Goglia, F., Horvath, T.L., 1998. Fasting-induced increase in type II iodothyronine deiodinase activity and messenger ribonucleic acid levels is not reversed by thyroxine in the rat hypothalamus. *Endocrinology* 139, 2879-2884.
- Ganji, F., Behzadi, G., 2007. Postnatal development of masseteric motoneurons in congenital hypothyroid rats. *Brain Res.* 1129, 81-88.
- Gelhaye, M., Martrette, J.M., Legrand-Frossi, C., Trabalon, M., 2006. Myosin heavy chain expression and muscle adaptation in rat. *Resp. Physiol. Neurobiol.* 154, 443-452.
- Gelhaye, M., Trabalon, M., Martrette, J.M., Legrand-Frossi, C., 2006. Effect of early olfactory deprivation on novelty seeking behavior and primary and secondary lymphoid organs in young rats. *Psychoneuroendocrinol.* 31, 997-1008.
- Gerling, S., Yahr, P., 1982. Maternal and paternal pheromones in gerbils. *Physiol. Behav.* 28, 667-673.
- Hahn, M.E., Lavooy, M.J., 2005. A review of the methods of studies on infant ultrasound production and maternal retrieval in small rodents. *Behav. Genet.* 35, 31-52.
- Hofer, M.A., Shair, H.N., 1992. Ultrasonic vocalization by rat pups during recovery from deep hypothermia. *Dev. Psychobiol.* 25, 511-528.
- Hongo, T., Hakuba, A., Shiota, K., Naruse, I., 2000. Suckling dysfunction caused by defects in the olfactory system in genetic arhinencephaly mice. *Biol. Neonate* 78, 293-299.
- Kalogjera, L., Pegan, B., Petric, V., 1991. Compensatory mechanisms induced by high oropharyngeal airway resistance in rats. *Acta Otolaryngol.* 111, 384-388.
- Kasdallah, A.G., Mornagui, B., Gharbi, N., Machghoul, S., El-Fazaa, S., 2005. Metabolic and endocrine effects of water and/or food deprivation in rats. *CR Biol.* 328, 463-470.
- Kelly, G.S., 2000. Peripheral metabolism of thyroid hormones: a review. *Altern. Med. Rev.* 5, 306-333.
- Kobal, S., Cebulj-Kadunc, N., Cestnik, V., 2000. Serum T3 and T4 concentrations in the adult rats treated with herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. *Pflugers Arch.* 440, 171-172.

- Kohrle, J., 1996. Thyroid hormone deiodinases--a selenoenzyme family acting as gate keepers to thyroid hormone action. *Acta Med. Austriaca.* 23, 17-30.
- Koibuchi, N., Chin, W.W., 2000. Thyroid hormone action and brain development. *Trends Endocrinol. Metab.* 11, 123-128.
- Ma, W., Miao, Z., Novotny, M.V., 1998. Role of the adrenal gland and adrenal-mediated chemosignals in suppression of estrus in the house mouse: the lee-boot effect revisited. *Biol. Reprod.* 59, 1317-1320.
- Meisami, E., 1976. Effects of olfactory deprivation on post natal growth of the rat olfactory bulb utilizing a new method for production of neonatal unilateral anosmia. *Brain Res.* 107, 437-444.
- Mirich, J.M., Brunjes, P.C., 2001. Activity modulates neuronal proliferation in the developing olfactory epithelium. *Brain Res. Dev. Brain Res.* 127, 77-80.
- Moore, C.L., 1982. Maternal behavior of rats is affected by hormonal condition of pups. *J. Comp. Physiol. Psychol.* 96, 123-129.
- Naito, H., Inoue, M., Makino, J., 2000. Ultrasonic isolation calls in genetically high- and low-emotional rat pups. *Exp. Anim.* 49, 289-294.
- Oberkotter, L.V., 1988. Suckling, but not formula feeding, induces a transient hyperthyroxinemia in rat pups. *Endocrinology* 123, 127-133.
- Schmidt, M., Okimoto, D.K., Dent, G.W., Gordon, M.K., Levine, S., 2002. Maternal regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in the 20-day-old rat: consequences of laboratory weaning. *J. Neuroendocrinol.* 14, 450-457.
- Sczerzenie, V.; Hsiao, S. Development of locomotion toward home nesting material in neonatal rats. *Dev. Psychobiol.* 1977, 10: 315-321.
- Silva, J.E., Larsen, P.R., 1983. Adrenergic activation of triiodothyronine production in brown adipose tissue. *Nature* 305, 712-713.
- Stahl, B., Distel, H., Hudson, R., 1990. Effects of reversible nare occlusion on the development of the olfactory epithelium in the rabbit nasal septum. *Cell. Tissue Res.* 259, 275-281.
- Stern, J.M., Azzara, A.V., 2002. Thermal control of mother-young contact revisited: hyperthermic rats nurse normally. *Physiol. Behav.* 77, 11-18.
- Stern, J.M., Johnson, S.K., 1990. Ventral somatosensory determinants of nursing behavior in Norway rats. I. Effects of variations in the quality and quantity of pup stimuli. *Physiol. Behav.* 47, 993-1011.

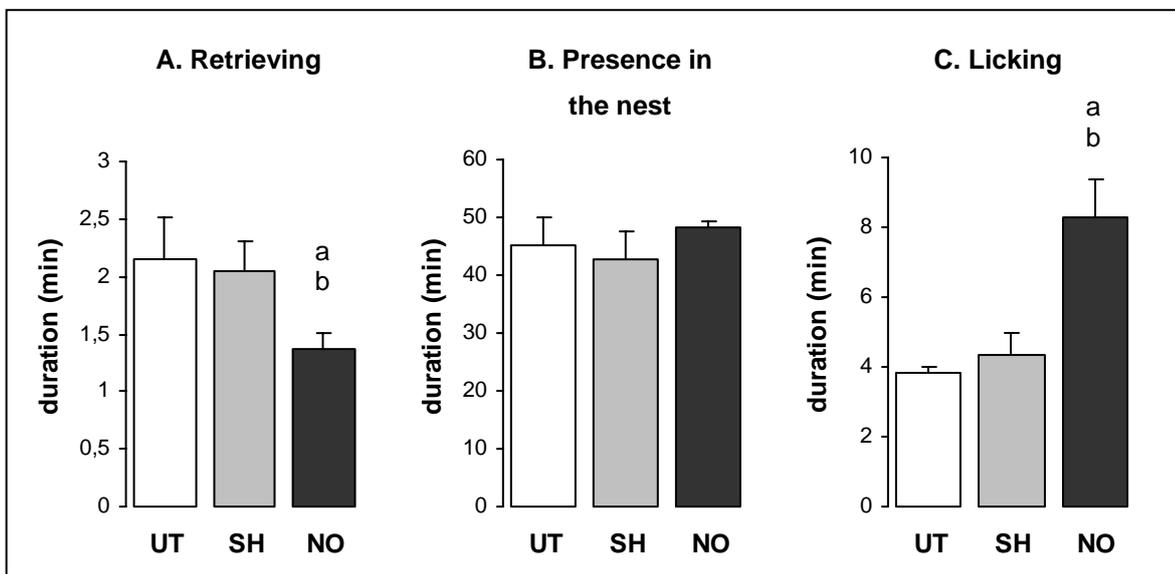
Sullivan, R.M., 2003. Developing a sense of safety: the neurobiology of neonatal attachment. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1008, 122-131.

Van Oers, H.J., De Kloet, E.R., Levine, S., 1999. Persistent effects of maternal deprivation on HPA regulation can be reversed by feeding and stroking, but not by dexamethasone. *J. Neuroendocrinol.* 11, 581-588.

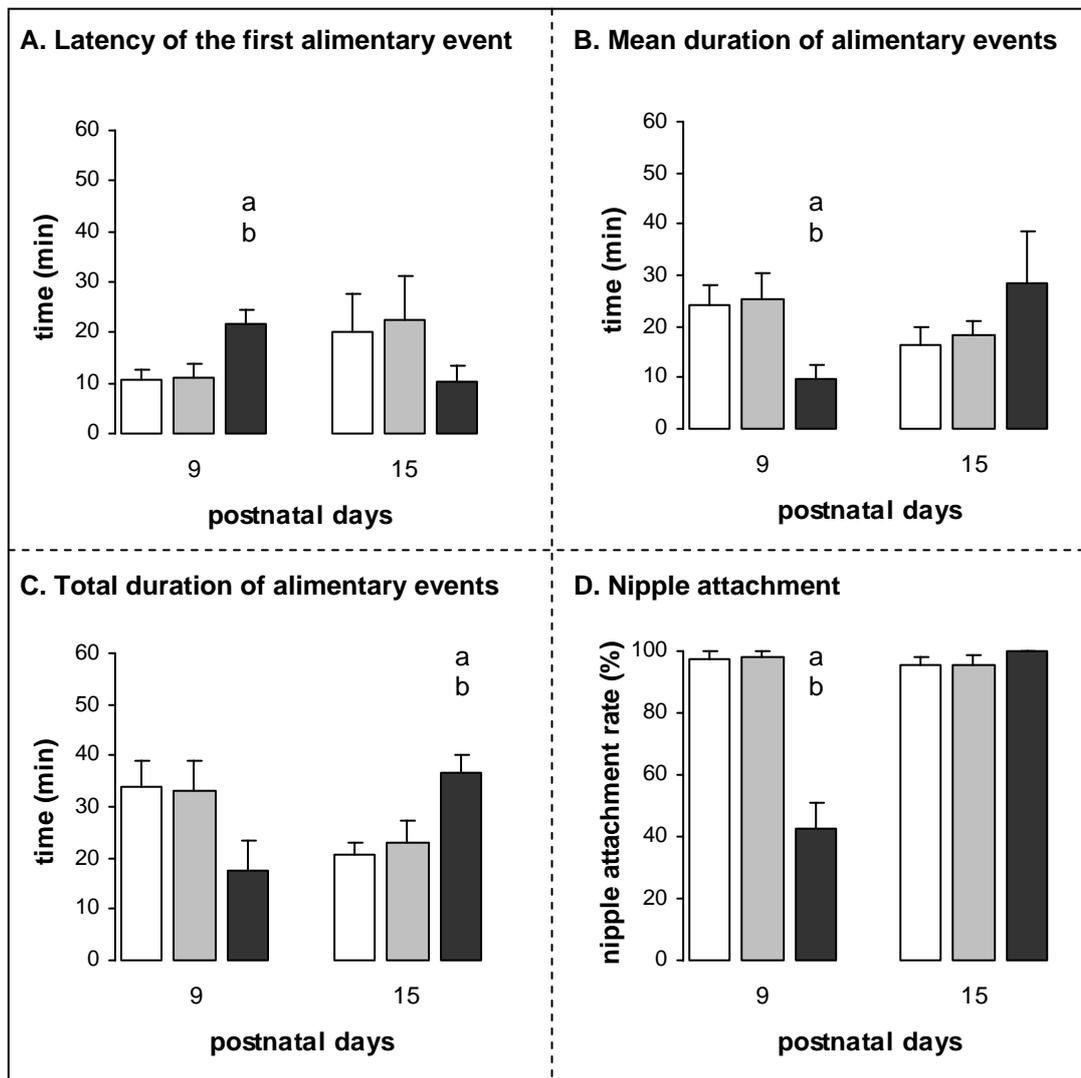
Waguespack, A.M., Reems, M.R., Butman, M.L., Cherry, J.A., Coppola, D.M., 2005. Naris occlusion alters olfactory marker protein immunoreactivity in olfactory epithelium. *Brain Res.* 1044, 1-7.

Walker, C.D., Deschamps, S., Proulx, K., Tu, M., Salzman, C., Woodside, B., Lupien, S., Gallo-Payet, N., Richard, D., 2004. Mother to infant or infant to mother? Reciprocal regulation of responsiveness to stress in rodents and the implications for humans. *J. Psychiatry Neurosci.* 29, 364-382.

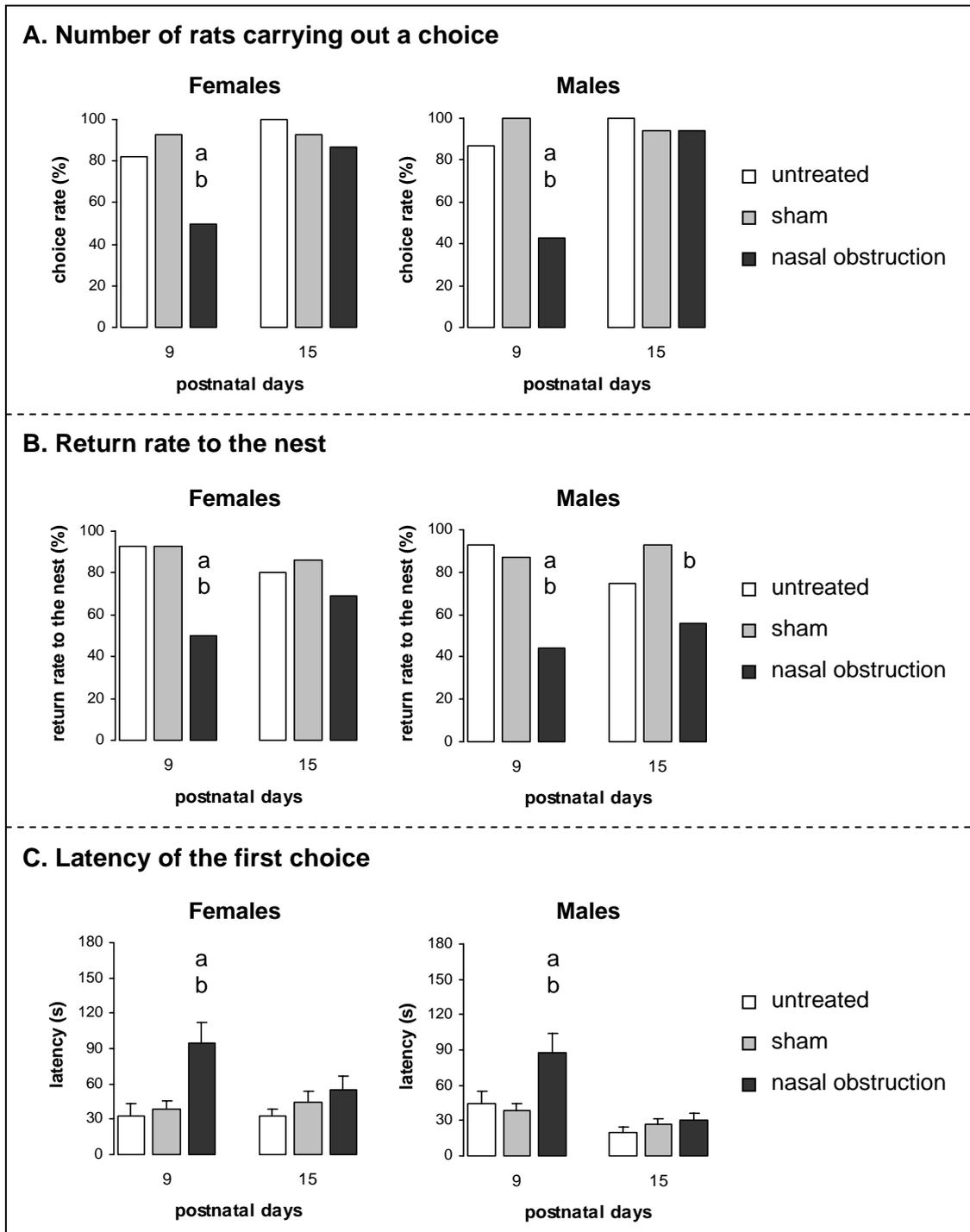
Waner, T., Nyska, A., 1988. Thyroxine (T4) and triiodothyronine (T3) levels in the Fischer 344 inbred rat. *Lab. Anim.* 22, 276-280.



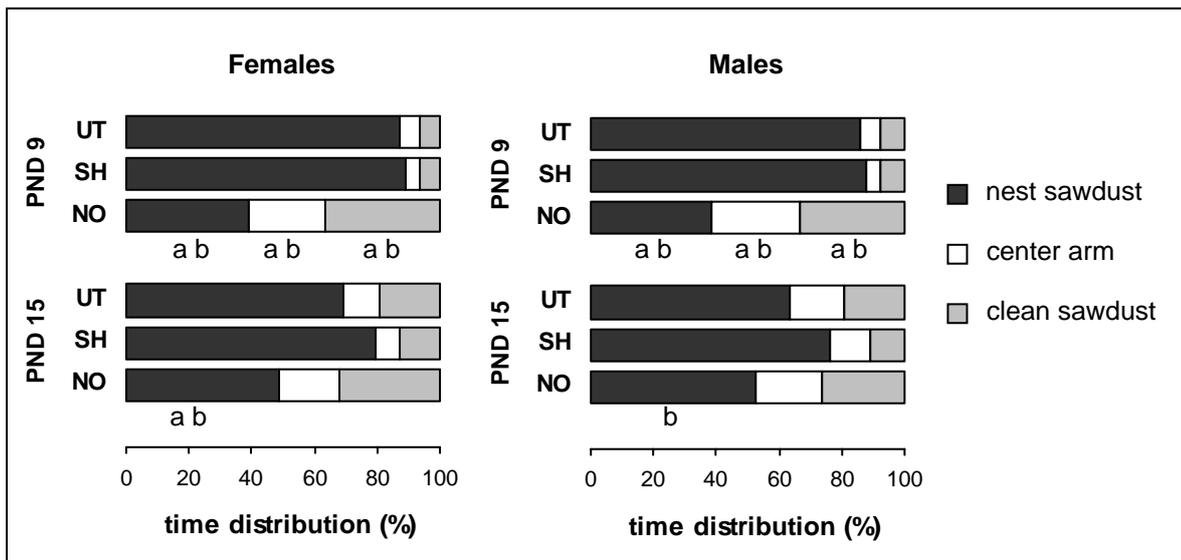
**Figure 1.** Maternal behavior at 9 days of age in untreated group (UT), sham group (SH) and animals with nasal obstruction (NO). (A) Duration of pup-retrieval, (B) duration of presence in the nest and (C) duration of pup-licking. Values are means  $\pm$  SE.  $n = 5$  mothers per group. Analysis of Kruskal-Wallis, pup-retrieval:  $H = 8.64$ ,  $p = 0.013$ ; presence in the nest:  $H = 0.56$ ,  $p = 0.756$ ; pup-licking:  $H = 8.18$ ,  $p = 0.017$ . Analysis of Mann-Whitney U-test: <sup>a</sup>  $p < 0.05$  versus untreated; <sup>b</sup>  $p < 0.05$  versus sham.



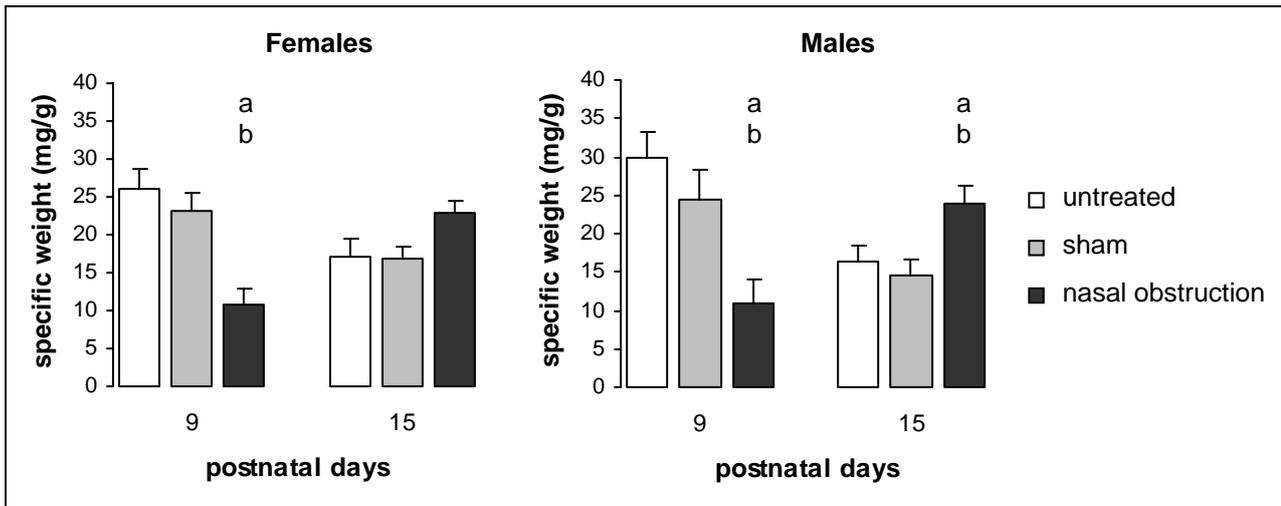
**Figure 2.** Suckling behavior at 9 and 15 days of age in untreated group (□), sham group (■) and animals with nasal obstruction (■). (A) Latency of the first alimentary event, (B) mean duration of alimentary events, (C) total duration of alimentary events and (D) maximum rate of nipple attachment. Values are means  $\pm$  SE.  $n = 5$  mothers per group;  $6 < n < 9$  alimentary events per age and per group. Analysis of Kruskal-Wallis, latency, PND 9:  $H = 6.62$ ,  $p = 0.037$ ; PND 15:  $H = 0.56$ ,  $p = 0.756$ . Mean duration, PND 9:  $H = 10.09$ ,  $p = 0.006$ ; PND 15:  $H = 5.43$ ,  $p = 0.066$ . Total duration, PND 9:  $H = 4.38$ ,  $p = 0.112$ ; PND 15:  $H = 6.66$ ,  $p = 0.036$ . Nipple attachment, PND 9:  $H = 14.73$ ,  $p = 0.0006$ ; PND 15:  $H = 2.21$ ,  $p = 0.332$ . Analysis of Mann-Whitney U-test: <sup>a</sup>  $p < 0.05$  versus untreated; <sup>b</sup>  $p < 0.05$  versus sham.



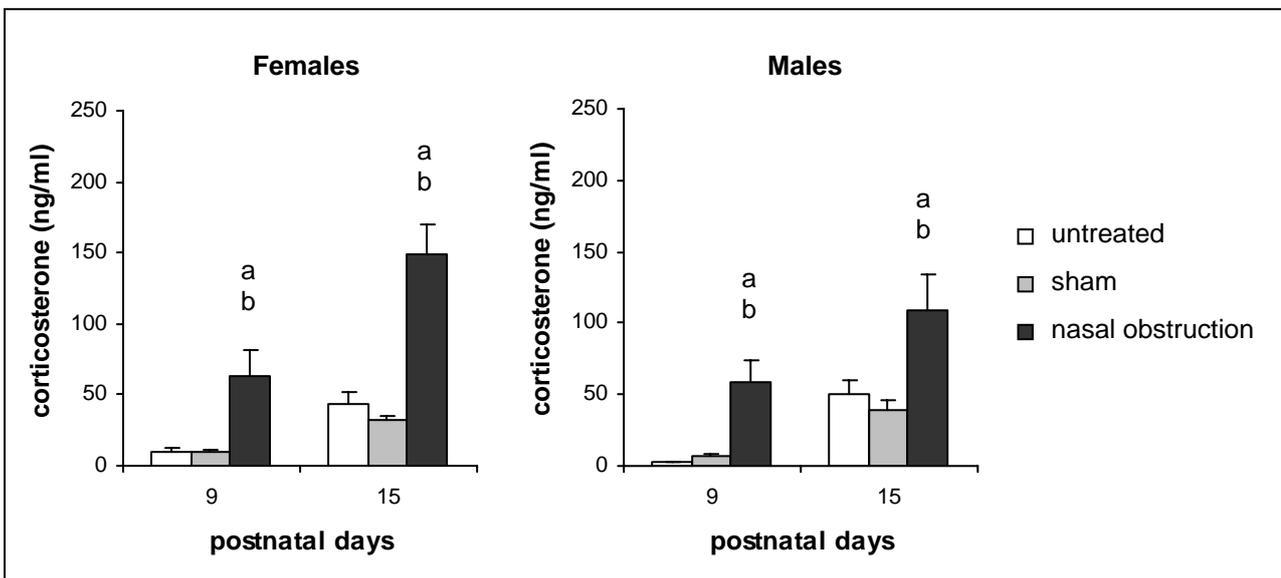
**Figure 3.** Impact of early nasal obstruction on animals' behavior in a two-choice situation: "nest sawdust vs. clean sawdust". (A) Number of rats carrying out a choice, (B) rate of return to the nest in first intention and (C) latency of the first choice at 9 and 15 days of age in untreated group, sham group and animals with nasal obstruction. Values are percentage (A and B) or means  $\pm$  SE (C).  $n = 15$  rats per sex and per group. Latency of the first choice: analysis of two-way ANOVA, treatment effect: PND 9:  $F = 7.56$  at two degrees of freedom,  $p < 0.0001$ ; PND 15:  $F = 1.93$  at two degrees of freedom,  $p = 0.101$ . Analysis of chi-square for independent data (A and B) or analysis of Fisher PLSD (C): <sup>a</sup>  $p < 0.05$  versus untreated; <sup>b</sup>  $p < 0.05$  versus sham.



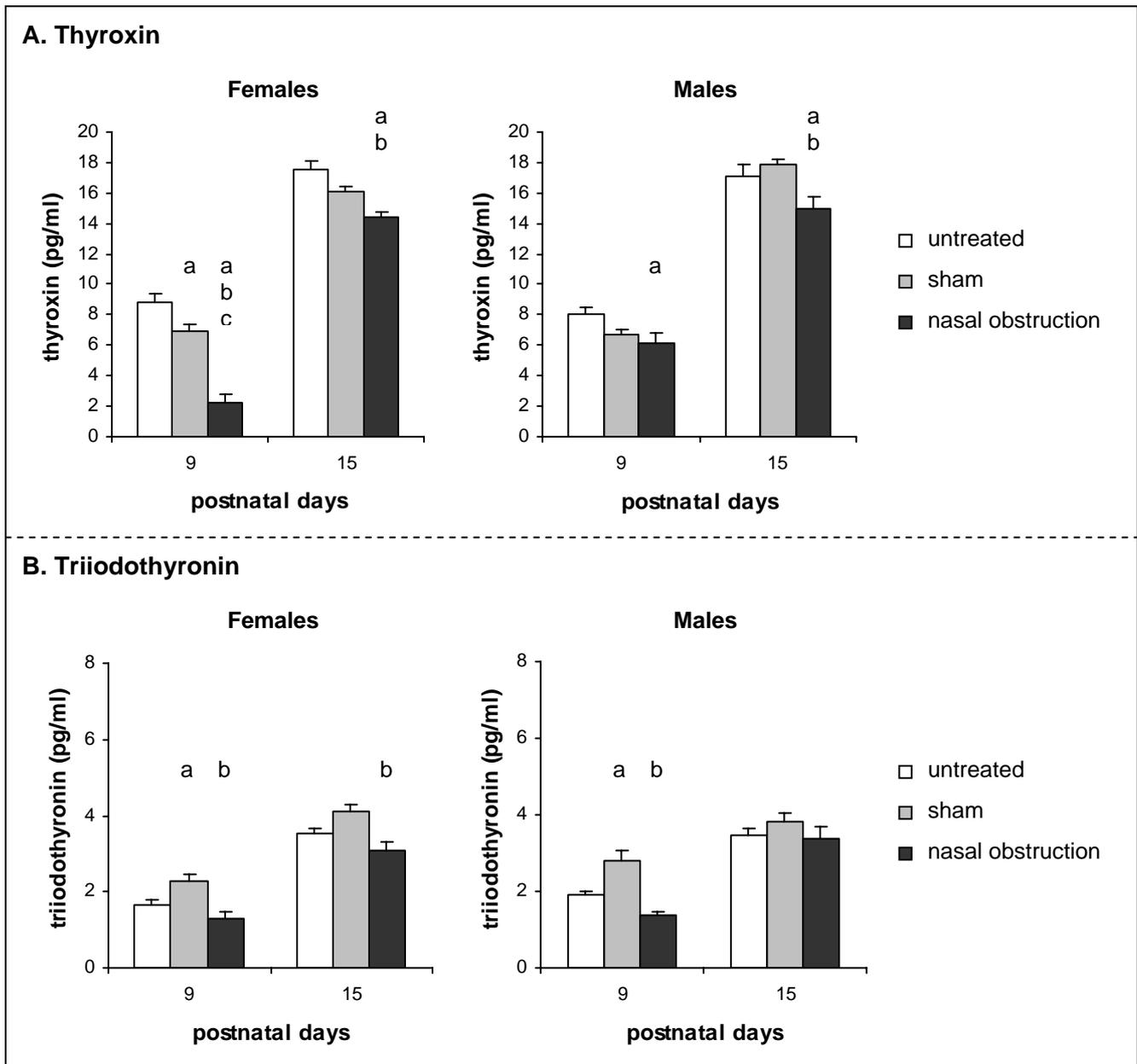
**Figure 4.** Distribution of the time spent in each arm of the T-maze in a two-choice situation, “nest sawdust vs. clean sawdust”, at 9 and 15 days of age in untreated group (UT), sham group (SH) and animals with nasal obstruction (NO). Values are means.  $n = 15$  rats per sex and per group. PND, postnatal days. Analysis of two-way ANOVA, treatment effect: PND 9:  $F = 9.58$  at two degrees of freedom,  $p < 0.0001$  for nest sawdust;  $F = 3.27$  at two degrees of freedom,  $p = 0.011$  for center arm;  $F = 4.02$  at two degrees of freedom,  $p = 0.003$  for clean sawdust. PND 15:  $F = 4.48$  at two degrees of freedom,  $p = 0.001$  for nest sawdust. Analysis of Fisher PLSD: <sup>a</sup>  $p < 0.05$  versus untreated; <sup>b</sup>  $p < 0.05$  versus sham.



**Figure 5.** Specific weight of gastric content at 9 and 15 days of age in untreated group, sham group and animals with nasal obstruction. Values are means  $\pm$  SE.  $n = 8$  rats per sex, per age and per group. Analysis of two-way ANOVA, treatment effect: PND 9:  $F = 7.30$  at two degrees of freedom,  $p < 0.0001$ ; PND 15:  $F = 3.18$  at two degrees of freedom,  $p = 0.016$ . Analysis of Fisher PLSD: <sup>a</sup>  $p < 0.05$  versus untreated; <sup>b</sup>  $p < 0.05$  versus sham.



**Figure 6.** Plasma corticosterone levels at 9 and 15 days of age in untreated group, sham group and animals with nasal obstruction. Values are means  $\pm$  SE.  $n = 8$  rats per sex, per age and per group. Analysis of two-way ANOVA, treatment effect: PND 9:  $F = 8.63$  at two degrees of freedom,  $p < 0.0001$ ; PND 15:  $F = 10.30$  at two degrees of freedom,  $p < 0.0001$ . Analysis of Fisher PLSD: <sup>a</sup>  $p < 0.01$  versus untreated; <sup>b</sup>  $p < 0.01$  versus sham.



**Figure 7.** Plasma thyroxin (A) and triiodothyronin (B) levels at 9 and 15 days of age in untreated group, sham group and animals with nasal obstruction. Values are means  $\pm$  SE.  $n = 8$  rats per sex, per age and per group. Analysis of two-way ANOVA, treatment effect: PND 9:  $F = 20.27$  at two degrees of freedom,  $p < 0.0001$ ; PND 15:  $F = 6.53$  at two degrees of freedom,  $p = 0.0002$ . Analysis of Fisher PLSD: <sup>a</sup>  $p < 0.05$  versus untreated; <sup>b</sup>  $p < 0.05$  versus sham.

**Table 1.** Body weight and body length at 9 and 15 days of age in untreated (UT), sham (SH) and nasal obstruction (NO) groups. The ponderal and longitudinal gains of each individual were calculated over the period PND 9 - PND 15.

		Weight (g)			Length (mm)		
		PND 9	PND 15	gain	PND 9	PND 15	gain
<b>Females</b>	<b>UT</b>	16.7 ± 0.6	29.8 ± 1.5	13.1 ± 1.5	72.2 ± 0.6	85.8 ± 1.3	13.6 ± 1.4
	<b>SH</b>	16.9 ± 0.5	29.1 ± 1.5	12.2 ± 1.6	70.0 ± 0.9	84.1 ± 0.9	14.1 ± 1.5
	<b>NO</b>	17.7 ± 0.5	24.0 ± 0.9 <sup>a, b</sup>	6.3 ± 1.1 <sup>a, b</sup>	69.0 ± 0.6 <sup>a</sup>	77.8 ± 1.2 <sup>a, b</sup>	8.8 ± 1.3 <sup>a, b</sup>
<b>Males</b>	<b>UT</b>	18.6 ± 0.6	30.3 ± 1.0	11.8 ± 0.7	71.3 ± 0.6	85.8 ± 0.5	14.5 ± 0.9
	<b>SH</b>	18.4 ± 0.4	30.0 ± 0.8	11.6 ± 0.8	71.5 ± 0.8	86.2 ± 0.6	14.8 ± 0.8
	<b>NO</b>	18.5 ± 0.4	23.1 ± 1.2 <sup>a, b</sup>	4.6 ± 1.1 <sup>a, b</sup>	68.3 ± 1.1 <sup>a, b</sup>	77.3 ± 1.0 <sup>a, b</sup>	9.1 ± 1.7 <sup>a, b</sup>

*n* = 15 rats per sex and per group. Values are means ± SE. PND, postnatal day. Analysis of Fisher PLSD: <sup>a</sup> *p* < 0.05 versus untreated; <sup>b</sup> *p* < 0.05 versus sham.