



REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR

ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE BADJI MOKHTAR ANNABA

Faculté des Sciences

Département de Biologie



THÈSE

Présentée par Mlle **DORBANI Asma**

Pour l'obtention du DIPLOME DE DOCTORAT

en écologie animale

**Obturation nasale et impact du lobe olfactif sur les
réponses adaptatives et comportementales chez le rat
Wistar**

Membres du jury

Président :

BOUSLAMA Zihad Pr U. ANNABA

Directeur:

BAIRI Abdelmadjid Pr U. ANNABA

Examineurs :

DJOUINI Amina MCA U. ANNABA

TADJINE Aicha Pr U. EL TAREF

MERZOUG Sameha Pr U. EL TAREF

Année Universitaire 2018/2019

Remerciements

Je voudrais tout d'abord remercier grandement mon directeur de thèse, monsieur BAIRI Abdelmadjid, pour la confiance qu'il m'a accordée en acceptant d'encadrer ce travail doctoral, pour ses multiples conseils et pour toutes les heures qu'il a consacrées à diriger cette recherche. J'aimerais également lui dire à quel point j'ai apprécié son aide et sa grande gentillesse. Enfin, j'ai été extrêmement sensible à ses qualités humaines d'écoute et de compréhension tout au long de ce travail doctoral.

Je remercie Mme. BOUSLAMA Zihad d'avoir accepté d'être présidente du jury.

J'adresse aussi mes remerciements au directeur de laboratoire de neuroscience monsieur TAHRAOUI Abdelkrim pour le prêt du matériel nécessaire pour la réalisation de certaines expériences.

Je souhaiterais exprimer ma gratitude à monsieur OUAKID Mohamed Laid pour m'avoir donné envie de réaliser une thèse. Je le remercie également pour son accueil chaleureux à chaque fois que j'ai sollicité son aide, ainsi que pour ses multiples encouragements, notamment lors de ma première publication.

Je désire aussi remercier monsieur BENYAKOUB Slim de m'avoir accueillie dans son laboratoire, tout en m'accordant sa confiance et une large indépendance dans la réalisation de mes travaux.

Merci également aux rapporteurs de cette thèse, Mme. DJOUNI Amina, Mme. TADJINE Aicha et Mme. MERZOUG Samiha, 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.

Je remercie tous les thésards notamment ceux avec qui j'ai eu l'occasion de travailler à l'animalerie et les autres simplement pour les bons moments partagés.

Dédicace

Je dédie ce modeste travail et ma profonde gratitude à l'âme de ma très chère **mère**, qui nous a quitté en 2017 et à qui je dois la réussite, pour l'éducation qu'elle m'a prodigué; avec tous les moyens et au prix de tous les sacrifices qu'elle a consentis à mon égard, pour le sens du devoir qu'elle m'a enseigné depuis mon enfance.

Même si tu n'es pas parmi nous, aujourd'hui je suis là grâce à toi. Repose en paix tendre
Mère.

Que Dieu t'accorde le plus haut degré du Paradis.

A l'âme de mon **père** que Dieu lui accorde toute sa miséricorde et l'accueille en son vaste paradis.

A mon frère **Mohamed Sabri** et mes sœurs **Nedjoua** et **Rym**, que Dieu vous gardent pour moi.

A mes neveux **Mohamed Anouar**, **Manar**, **Amine**, **Melina** et **Nelya** à qui je souhaite beaucoup de réussite.

A toutes **mes amies** sans exception

ملخص

يعيش الإنسان في عالم تهيمن عليه الأحاسيس البصرية والسمعية. من ناحية أخرى، لدى بعض الكائنات مثل القوارض، الشم هو شعور أكثر تطوراً وحيوية. يتمثل نشاط الشم في العديد من المجالات مثل التكاثر والغذاء والسلوك الاجتماعي وحتى اكتشاف الحيوانات المفترسة. من أجل معرفة ما إذا كان غياب الشم يمكن أن يزعج السلوك الاستكشافي اللازم لتوجيه الثدييات ويسبب ضغوطاً من شأنها أن تزعج تطور الفرد، تم إحداث حشوة ثنائية الأنف (ON) في الفئران الصغيرة. من سلالة ويستار في اليوم الثامن بعد الولادة. تم فحص عواقبه بعد 24 ساعة من العلاج (D9)، في نهاية فترة السدادة (D15) وبعد ستة أيام من إعادة فتح الخياشيم (D21). تم إجراء دراسة سلوكية وتم أخذ عينات من المستخلصات البيولوجية. تظهر نتائجنا أن ON يعطل بشكل فعال السلوك الاستكشافي للأفراد. نتيجة لذلك، يتم تغيير الاتجاه نحو الروائح المألوفة وردود الفعل على الأداء في مهمة التعلم المكاني. كما أنه يقلل من تناول الطعام ونمو الأفراد. على الفئران أيضاً تطوير التنفس عن طريق الفم المزمع المرتبطة بالتكيف الهيكلي لعضلات الفم والوجه. على مستوى الغدد الصماء، تسبب ON تغيرات هرمونية تكون بشكل عام أكثر وضوحاً عند الإناث. في الجهاز المناعي، تسبب ON ضمور الدماغ. بالنسبة للفئران، فإن سد الأنف بشكل بالتالي وضعية مرهقة متعددة العوامل.

الكلمات المفتاحية: سدادة الأنف ، غياب الشم ، الفلق ، السلوك الاستكشافي ، جردان ويستار

Résumé :

L'Homme vit dans un monde dominé par les sensations visuelles et auditives. Par contre chez d'autres espèces, telles que les rongeurs, l'odorat est un sens beaucoup plus développé et vital. L'olfaction intervient dans de nombreux domaines tels que la reproduction, l'alimentation, les comportements sociaux, ou encore la détection de prédateurs. Afin de savoir si l'absence de l'olfaction pouvait perturber le comportement exploratoire nécessaire à l'orientation des mammifères et provoquer un stress qui perturberait le développement de l'individu, une obturation nasale (ON) bilatérale a été induite chez des jeunes rats de la souche Wistar au 8^{ème} jour postnatal. Ses conséquences ont été examinées 24h après le traitement (J9), à la fin de la période d'obturation (J15) et six jours après la réouverture des narines (J21). Une étude comportementale a été réalisée et des prélèvements des extraits biologiques ont été effectués. 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 rats ON développent par ailleurs une respiration buccale chronique associée à une adaptation structurale des muscles oro-faciaux. Au niveau endocrinien, l'ON entraîne des modifications hormonales qui sont globalement plus marquées chez les femelles. Au niveau du système immunitaire, l'ON provoque une atrophie du cerveau. Pour le rat, l'obturation nasale constitue donc une situation stressante multifactorielle.

Mots clés : Obturation Nasale, privation olfactive, anxiété, comportement exploratoire, rat Wistar.

Abstract :

Humans often view smell as an aesthetic sense, yet for most animals smell is the primal sense. One they rely on to identify food, predators and mates. Indeed, for many organisms, odors are their most efficient means of communicating with others and interpreting their surroundings. Innate behavior in response to smell is essential to these organisms' survival and most likely results from nonconscious perception of odors. This work is part of a research program dealing with the consequences of bilateral nasal obturation (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. In addition, some hormonal modifications were pronounced at D9, D15 and D21. Lastly, NO was associated with an atrophy of the brain at D15, it was maintained until D21. In rats, nasal obturation can thus be considered like a multifactorial stressful situation. Its impacts could persist at the adulthood.

Keywords : Nasal Obturation, Olfactory deprivation, anxiety, Exploratory Behaviour, rat Wistar.

<u>SOMMAIRE</u>	<u>Page</u>
LISTE DES FIGURES	9
LISTE DES TABLEAUX	10
LISTE DES ABREVIATIONS	11
LISTE DES PUBLICATIONS	12
INTRODUCTION	14
MATERIELS ET METHODES	22
1. Matériel biologique	22
1.1. Modèle animal	22
1.2. Conditions d'élevage	23
2. Méthodes	24
2.1. Protocole d'obturation nasale	24
<i>2.1.1. Anesthésie</i>	24
<i>2.2.2. Obturation nasale</i>	24
2.2. Constitution des lots expérimentaux	24
2.3. Suivi des portées	25
2.4. Etude comportementale	25
2.4.1. Test du labyrinthe en croix (plus maze)	25

2.4.2 Test du champ ouvert (l'open-field)	26
2.5. Evaluation de la reconnaissance olfactive	27
2.6. Prélèvements des extraits biologiques	28
2.7. Analyses statistiques	29
RESULTATS	30
1. Comportement des rats après l'obturation nasale	30
1.1. Croissance pondérale	31
2. Paramètres comportementaux	32
2.1. Open Field (test de champs ouvert)	32
a) Temps passé au centre du dispositif	32
b) Temps passé à la périphérie du dispositif	33
c) Temps passé à la bordure du dispositif	34
d) Redressements et défécations	35
2.2.Plus Maze (test de croix surélevée)	35
a) Temps passé au centre du dispositif	36
b) Temps passé dans les bras fermés du dispositif	37
c) Temps passé dans les bras ouverts du dispositif	38
d) Redressements et défécation	39

2.3. Reconnaissance olfactive	40
a) Temps de latence avant d'effectuer un choix « sciure propre x sciure nid »	40
b) Choix du compartiment à sciure propre	41
c) Choix du compartiment à sciure nid	42
3. Paramètres biologiques	43
3.1. Glycémie	44
3.2. Variations du taux d'ACTH	46
3.3. FNS	47
3.4. Dosage de la testostérone et de la progestérone	48
4. Evaluation de la masse du cerveau	49
DISCUSSION	50
CONCLUSION ET PERSPECTIVES	66
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUE	68

<u>Liste des figures</u>	<u>Page</u>
Figure 1 : Dispositif utilisé dans le test du labyrinthe en croix surélevée (plus maze)	26
Figure 2: Enceinte utilisée dans le test de champ ouvert (l'open –Field)	27

Figure 3 : Dispositif expérimental utilisé pour mesurer la reconnaissance olfactive	28
Figure 4 : Taux de mortalité (%) cumulé chez les animaux exposés à l'obstruction nasale (n=30)	30
Figure 5 : Croissance pondérale (g) et gain pondéral (g) des animaux témoins, contrôles et obstruction nasale entre le 9ème et le 21ème jour postnatal	32
Figure 6 : Temps (s) passé au centre du dispositif Open Field pour les rats ON, contrôles et témoins	33
Figure 7 : Temps (s) passé à la périphérie du dispositif Open Field pour les rats ON, contrôles et témoins	34
Figure 8 : Temps (s) passé à la bordure du dispositif Open Field pour les rats ON, contrôles et témoins	34
Figure 9 : Variations du nombre de redressements et de défécations entre les rats ON, contrôles et témoins au niveau du dispositif Open Field	36
Figure 10 : Temps (s) passé au centre du dispositif Plus Maze pour les rats ON, contrôles et témoins	37
Figure 11 : Temps (s) passé aux bras fermés du dispositif Plus Maze pour les rats ON, contrôles et témoins	38
Figure 12 : Temps (s) passé aux bras ouverts du dispositif Plus Maze pour les rats ON, contrôles et témoins	39
Figure 13 : Variations du nombre de redressements et de défécations entre les rats ON, contrôles et témoins au niveau du dispositif Plus Maze	40
Figure 14 : Temps (s) de latence avant d'effectuer un choix chez les animaux exposés à une obturation nasale, contrôles et témoins au test « sciure propre x	41

sciure nid »	
Figure 15 : Variations du temps (s) passé chaque compartiment dans le cadre du test « sciure propre x sciure nid » entre les rats ON, contrôles et témoins	43
Figure 16 : Valeurs moyennes du glucose sanguin (g/l) chez les Rats ON, contrôles et témoins	44
Figure 17 : Variations du taux d'ACTH plasmatique (pg/ml) entre les groupes expérimentaux	45
Figure 18 : Dosage sanguin de testostérone (ng/ml) et de progestérone (nmol/l) des groupes expérimentaux	48
Figure 19 : Poids moyen (g) du cerveau chez les rats ON, contrôles et témoins	49

<u>Liste des tableaux</u>	<u>Page</u>
Tableau 1: Evaluation des paramètres hématologiques des rats expérimentaux mâles à J9, J15 et J21	46
Tableau 2: Evaluation des paramètres hématologiques des rats expérimentaux femelles à J9, J15 et J21	47

Liste des abréviations :

ACTH	adrenocorticotropie hormone
AVP	arginine-vasopressine
BF	Bras fermés
BO	Bras ouverts
C	Groupe contrôle
CMH	Complexe Majeur d'Histocompatibilité
CRH	Corticotropin-Releasing Hormone
EDTA	Ethylene Diamine Tetra Acetic
EO	Eosinophiles polynucléaires
FNS	Formule Numération Sanguine
GB	Globules Blancs
GR	Globules Rouges
J8, J9...	Jour postnatal 8,9.....
LYMPH	Lymphocytes
MONO	Monocytes
NEUT	Neutrophiles granulocytes
NS	Non significatif

ON	Groupe Obturation Nasale
SP	Sciure Propre
SN	Sciure Nid
T	Groupe Témoin
T3	Triiodothyronine
T4	Thyroxine

Liste des publications :

Article 1 : Dorbani A., Ouakid M.L., Bairi A., Tahraoui A., 2014. Stress de Séparation et Perturbations Olfactives et Comportementales chez le Rat Wistar. *Tunis. J. Med. Plants Nat. Prod.* 2014; 12: 1-8.

Article 2 : Dorbani A., Ouakid M.L., Bairi A., Tahraoui A., 2015. Endocrine and Immunological Alterations under Early Nasal Obstruction in Rats Wistar. *J Neonatal Biol* 2015, 4:199.

Article 3: Dorbani A., Ouakid M.L., Bairi A., Tahraoui A., 2018. Developmental perturbations in rats Wistar under early nasal obstruction. *Journal of Science a journal of science, engineering and technology* 282-2018-KJS.

Article 4: Dorbani A., Bairi A., Tahraoui A., 2019. Effects of Nasal Obstruction on Hormonal and Immune Functions in Wistar Rats *Advances in Animal and Veterinary Sciences.* June 2019 / Volume 7 / Issue 6 / Page 447.

Communications affichées :

Dorbani A., Ouakid M.L., Bairi A., Tahraoui A., 2013. Stress de Séparation et Perturbations Olfactives et Comportementales chez le Rat Wistar. *1^{er} Symposium de Biotechnologie & Valorisation des Bio-Ressources 05-06 Mars 2013, Institut Supérieur de Biotechnologie de Béja.*

Dorbani A., Ouakid M.L., Bairi A., 2014. Obturation nasale et impact du lobe olfactif sur les réponses adaptatives et comportementales chez le rat wistar Association Tunisienne de Physiologie et Bio-surveillance de l'Environnement 3ème Congrès International de l'ATP-BE (2014) 15- 18 décembre 2014. Sousse. Tunisie.

INTRODUCTION

L'odorat est le sens le plus sensible et le plus subtil, le nez est un détecteur de molécules odorantes très précis. L'olfaction, ou odorat, est le sens qui permet la perception des substances chimiques volatiles (ou odeurs) présentes dans l'environnement. L'olfaction est souvent considérée comme un sens « primitif », au cours de l'évolution de nombreux gènes codant pour des récepteurs olfactifs sont devenus des pseudogènes chez l'Homme. Ainsi, le monde vivant est dominé par les sensations visuelles et auditives. Par contre l'olfaction est un sens beaucoup plus développé et vital chez d'autres espèces, telles que les rongeurs, c'est une source considérable d'informations sur le monde qui les entoure (Johnson et al, 2003).

L'olfaction intervient dans de nombreux domaines tels que la reproduction, l'alimentation, les comportements sociaux, ou encore la détection de prédateurs. On pourrait l'assimiler à un équivalent de la parole et de l'écriture chez l'Homme, car il permet la communication entre individus d'une même espèce, directe ou indirecte. On parle alors de système olfactif pour mieux indiquer le côté ubiquitaire de ce sens (Laing, 1983).

Le système olfactif est un système sensoriel spécialisé dans la détection et le traitement d'informations chimiques volatiles, les molécules odorantes.

Contrairement à la vision, c'est un système sensoriel relativement plastique. Une molécule inconnue pourra toujours être détectée, même si la sensation olfactive sera faible au début, le système olfactif développera par la suite les récepteurs permettant de la détecter plus efficacement (Duchamp-Viret, 2012).

On peut diviser les Mammifères en trois groupes en ce qui concerne leurs capacités olfactives:

- _ Les **anosmiques**, qui sont dépourvus du sens de l'odorat (comprend certains cétacés).
- _ Les **microsmates**, qui ont un odorat peu développé (les primates, dont l'Homme, en font partie, de même que certaines espèces aquatiques).

_ Les **macrosmates**, qui ont un odorat bien développé (comporte entre autres les rongeurs, les lagomorphes, les carnivores, les ongulés et les insectivores).

De manière générale, les Mammifères ayant une vie essentiellement aquatique sont anosmiques ou microsmates. Alors que les animaux vivant dans l'obscurité, tels que les taupes, ont un sens de l'odorat très développé.

Animal macrosmate, le rat possède un système olfactif particulièrement développé par rapport à la taille de son cerveau. L'anatomie de ce système est bien connue et relativement simple.

L'échantillonnage d'une odeur s'accompagne souvent d'une orientation de la tête vers la source odorante ainsi que d'une modification de l'activité respiratoire qui peut se traduire par une augmentation de l'amplitude des mouvements respiratoires ou de leur fréquence (flairage) (Laing, 1983, Sobel et al, 2001, Johnson et al, 2003). L'arrivée du stimulus olfactif sur les neurorécepteurs olfactifs est donc modulée par la respiration qui conditionne le nombre d'échantillonnages, leur durée et leur fréquence.

Le traitement de l'information olfactive est donc nécessairement soumis à une importante variabilité. Or, même si la perception olfactive est fiable, la reconnaissance d'une odeur n'est souvent pas immédiate, et est souvent devancée par le rappel des souvenirs qu'elle évoque (Johnson et al, 2003).

Le bulbe olfactif, premier relais cortical de l'information olfactive, a l'avantage d'être très accessible et anatomiquement indépendant par rapport au reste du cerveau. En outre, les voies sensorielles olfactives constituent une voie d'entrée directe et rapide vers les structures impliquées dans les processus mnésiques puisque deux synapses seulement séparent les neurorécepteurs olfactifs du cortex entorhinal et de l'hippocampe.

Le bulbe olfactif est un organe pair qui compose la partie la plus antérieure du cerveau. Il constitue une structure relais de l'information sensorielle olfactive. Il reçoit les afférences de l'épithélium olfactif (acheminées par le nerf olfactif) et transmet l'information sensorielle à des structures corticales et sous-corticales (Shepherd et *al.*, 2004). Les axones des cellules de projections du bulbe olfactif forment le tractus olfactif latéral. Contrairement aux autres systèmes sensoriels, le système olfactif ne présente pas de relais thalamique (Shepherd, 2005). Le bulbe olfactif est donc l'unique relais entre l'organe sensoriel (l'épithélium olfactif) et le cortex. Le bulbe olfactif n'est cependant pas un relais passif de l'information. Il est le siège d'une importante transformation des entrées sensorielles, pour l'essentiel monotoniques (Duchamp-Viret et *al.*, 1999 ; Ma et *al.*, 1999 ; Friedrich et Laurent, 2001), ajoutant des composantes spatiales et temporelles dans l'information sensorielle qu'il reçoit. Le bulbe olfactif est également la cible de nombreuses voies centrifuges dont l'action participe à la transformation de l'information au sein de cette structure et vraisemblablement à la formation de traces mnésiques (Mouly et *al.*, 1993 ; Ravel et *al.*, 1994 ; Keverne, 1995 ; Brennan et Keverne, 1997).

Les études sur la neurobiologie de la mémoire olfactive ont permis de montrer que, comme pour les autres modalités sensorielles, des régions cérébrales considérées initialement comme essentiellement dédiées au traitement de l'information sensorielle participent également aux circuits neuronaux impliqués dans les processus mnésiques. En cela, ce système illustre parfaitement le concept actuel d'une mémoire distribuée faisant intervenir toutes les aires cérébrales activées au moment de l'encodage d'un stimulus.

L'importance de l'olfaction pour l'espèce humaine est à mettre en relation avec son interaction avec la gustation. En effet, une grande partie de l'appréciation des aliments vient

de l'olfaction rétro-nasale, conférant le caractère hédonique aux aliments ingérés (Shepherd, 2004). Il n'est d'ailleurs pas rare qu'une anosmie traumatique s'accompagne d'une dépression. La bulbectomie bilatérale a d'ailleurs été utilisée au début du siècle dernier comme modèle de dépression chez le rat (Song et Leonard, 2005).

L'obturation 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'obturation 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. 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'obturation 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'obturation nasale

ne seront pas abordés ici. Sur le plan général, l'obturation 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.

Au cours de la période postnatale, l'obturation 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 neuroendocrine au stress. L'obturation nasale bilatérale pourrait donc constituer une situation stressante multifactorielle. Dans le cas où elle se traduirait effectivement par la mise en place d'une réponse au stress, l'obturation nasale représenterait une situation stressante chronique, c'est-à-dire une perturbation relativement modérée se prolongeant sur plusieurs jours (Pacak et Palkovits, 2001).

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 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).

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.

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.

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).

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 synaptogenèse (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).

Dans le cadre de notre étude, nous avons focalisé nos observations sur les conséquences générales de l'obturation nasale. Dans un premier temps, nous nous intéresserons aux troubles comportementaux associés à l'obturation des narines. Nous verrons qu'en modifiant la fonction olfactive, l'obturation nasale précoce est susceptible d'influencer l'activité exploratrice d'investigation et d'orientation. Dans un second temps, nous aborderons les conséquences de l'obturation nasale sur la fonction endocrine et immunitaire. Finalement, nous verrons qu'en perturbant la respiration et l'olfaction, l'obturation nasale pourrait constituer une situation stressante multifactorielle susceptible de perturber le développement de certains systèmes physiologiques périphériques.

MATERIELS ET METHODES

1. Matériel biologique

1.1. Modèle animal : Nous avons utilisé dans le cadre de cette étude des rats mâles et femelles adultes *Rattus rattus* de la souche Wistar, classe des mammifères nocturnes de l'ordre des rongeurs provenant de l'institut Pasteur d'Alger et pesant (250g \pm 10g). L'expérience porte sur leurs descendance.

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 et peuvent être divisées en trois phases successives (Lee et Williams, 1977) :

- Une **1ère 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 **2ème phase** constitue une étape importante du développement neurosensoriel et moteur des ratons. Ils acquièrent progressivement l'audition (à partir du 10ème jour), la locomotion quadrupède (autour du 12ème jour), la vision (vers 14 jours) et l'endothermie (jusqu'au 15ème 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 **3ème phase** débute vers le 15ème 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 18ème jour postnatal. Le répertoire comportemental s'accroît de façon importante jusqu'à ressembler à celui des adultes aux

alentours du 21^{ème} jour. A cette date, on considère que les rats ont achevé leur développement neurosensoriel.

Dans le cadre de notre travail, l'obturation nasale est induite le 8^{ème} 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^{ème} jour postnatal) et après (15^{ème} jour postnatal) l'acquisition de l'audition et de la vision.

De plus, l'induction d'une obturation nasale au cours des premiers jours de vie se traduit par un taux de mortalité excessif chez les animaux expérimentaux. Le choix du 8^{ème} 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.

1.2. Conditions d'élevage : Les animaux sont élevés dans une animalerie à température ambiante à 20 ± 2 °C, ils sont soumis à un régime photopériodique naturel et une hygrométrie relative de 50 à 60%. Les rats sont maintenus dans des cages en polyéthylène tapissées de litière composée de copeaux de bois nettoyées régulièrement tous les deux jours. La nourriture se présente sous forme de « bouchons » ou pellets constituées essentiellement de soja et de maïs. L'eau leur est fournie dans des biberons. Les rats ont un accès libre à l'eau et à l'aliment (ad libitum). Les animaux sont acclimatés aux conditions de l'animalerie du

département de Biologie- Annaba pendant une quinzaine de jours avant l'expérimentation. Le travail expérimental est effectué sur 10 portées nées et élevées au laboratoire.

2. Méthodes :

2.1. Protocole d'obturation nasale :

2.1.1. Anesthésie : afin de pouvoir manipuler les jeunes rats et réaliser une obturation nasale bilatérale sans aucun danger, les rongeurs ont été anesthésiés à l'éther dans des cloches en verre, le rat est placé à l'intérieur pendant quelques secondes. Cette procédure est indiquée pour les anesthésies de courte durée chez les rongeurs nouveau-nés.

2.2.2. Obturation nasale :

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 obturation 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 à usage local (Auréomycine Evans dermique 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.

2.2. Constitution des lots expérimentaux :

Au cours du 8ème jour postnatal (J8), les portées sont réparties aléatoirement en trois lots expérimentaux :

- **Groupe obturation nasale (ON)** (n=30): Les animaux anesthésiés sont soumis à une cautérisation bilatérale des narines
- **Groupe contrôle (C)** (n=16): 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)** (n=16) : les jeunes ne subissent aucune manipulation.

Après ces différentes opérations, les portées contrôle et obturation nasale sont rendues à leurs mères respectives.

2.3. Suivi des portées :

Du 8^{ème} au 21^{ème} jour post-natal, les jeunes sont observés au quotidien afin de noter :

- Le gain de poids, exprimé en g, représente la différence entre le poids final et le poids initial des animaux. Le gain de poids permet l'évaluation des performances de croissance. Le gain de poids (GP) (g) a été calculé comme suit: [Poids final (g) - Poids initial (g)].
- La date exacte de réouverture des narines des lots ON (n=16). 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'obturation nasale. Lorsqu'il y a apparition de bulles d'air, les narines sont considérées ouvertes et l'obturation nasale achevée.
- Le taux de mortalité dans chacun des lots expérimentaux.

2.4. Etude comportementale :

2.4.1. Test du labyrinthe en croix (plus maze) : Dans le test, chaque raton était initialement positionné au centre du labyrinthe situé à l'intersection des quatre bras, la tête orientée vers l'un des bras ouverts (BO); il avait libre accès aux quatre bras pendant une durée de 5 min. Le labyrinthe était disposé dans une pièce isolée du bruit. L'expérimentateur visualisait le comportement du rat de l'extérieur de la pièce, grâce à une caméra vidéo ; il relevait les nombres de visites et temps passés respectivement dans les BO et dans les bras fermés (BF); une visite était comptabilisée lorsque le rat avait les quatre pattes à l'intérieur de l'un des deux dispositifs (BO ou BF). Les résultats ont été exprimés en :

- Temps passés (s) dans les bras ouverts (BO) et bras fermés (BF).
- Temps passés (s) dans le centre.
- Nombre de redressements.
- Nombre de défécations.

Ce test est un indice de l'état émotionnel du rat Wistar.



Figure 1 : Dispositif utilisé dans le test du labyrinthe en croix surélevée (plus maze).

2.4.2 Test du champ ouvert (l'open-field) : Ce test est un dispositif comprenant une large boîte rectangulaire ouverte (90 cm x, 70 cm x, et 60 cm x), à fond blanc, et fortement éclairée du dessus (500 lux). Des lignes noires au sol délimitaient des carreaux (10 x 10 cm) (Dauge et al., 1989). C'est le plus courant. Il consiste à placer l'animal dans un environnement nouveau inconnu, pauvre en stimulation, ne comportant aucune possibilité d'abri ou de fuite.

L'animal est alors en situation d'isolement social, ce qui représente déjà une situation de stress, ou en situation aversive. Le premier à l'avoir utilisé est Hall en 1934.

Chaque rat était initialement placé dans un des quatre coins de l'Open-Field, la tête orientée vers le coin. Son comportement était observé pendant 5 minutes. Cinq paramètres étaient mesurés par l'expérimentateur :

- Temps passé dans le centre exprimé en secondes.
- Temps passé dans la périphérie exprimé en secondes.
- Temps passé dans la bordure exprimé en secondes.
- Nombre de redressements.
- Le nombre de défécations.

Ainsi, ce test évalue les capacités exploratoires du rat dans un contexte stressant. Le nombre de redressements reflètent son activité exploratoire et son état émotionnel.

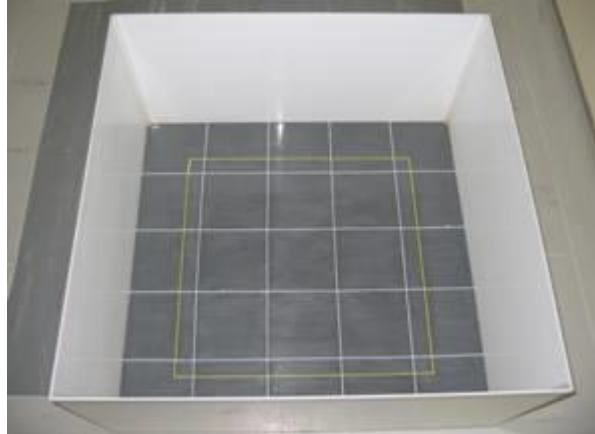


Figure 2: Enceinte utilisée dans le test de champ ouvert (l'open -Field).

2.5. Evaluation de la reconnaissance olfactive : Ce test nous permet d'apprécier la reconnaissance olfactive de l'environnement directe des animaux à J9, J15 et J21. Afin d'évaluer la capacité des individus à reconnaître et à s'orienter vers les odeurs familières, nous avons constitué deux types de sciure : l'une propre (SP) et l'autre ayant été utilisée dans un nid (SN).

Les rats sont soumis à l'odeur provenant d'une enceinte expérimentale dont le sol est recouvert de sciure propre. L'autre enceinte contient la sciure imprégnée d'urine et de fèces maternels prélevée dans la cage d'élevage 5 min avant le début du test. Les enceintes expérimentales sont placées de façon aléatoire d'un côté ou de l'autre du labyrinthe. Le labyrinthe est brièvement nettoyé à l'alcool à 70° puis laissé à sécher durant le passage de deux individus (8 min environ).

Les différents paramètres sont pris en compte :

- Le temps de latence, temps nécessaire avant d'effectuer le 1er choix.
- Le temps passé dans chaque type de sciures.

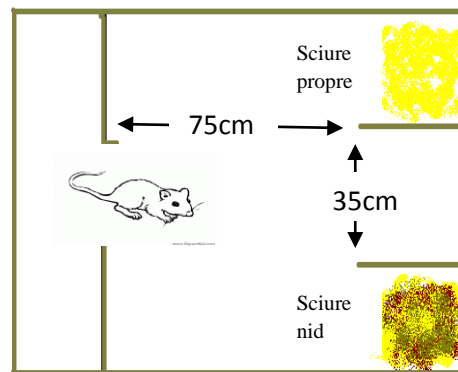


Figure 3 : Dispositif expérimental utilisé pour mesurer la reconnaissance olfactive.

2.6. Prélèvements des extraits biologiques :

Après ces différentes opérations, les rats sont sacrifiés à J9, d'autres à J15 et ceux qui restent à J21, pesés puis disséqués rapidement. Différents extraits biologiques sont prélevés sur chacun des individus :

Les prélèvements sanguins sont effectués dans des tubes EDTA pour faire l'analyse de FNS, la glycémie est mesurée immédiatement avec un glucomètre. Le sang prélevé sous héparine est centrifugé à 1480 tours/min, pendant 10 minutes, pour obtenir le sérum. Celui-ci a été

conservé à -20 ° C jusqu'à la réalisation des dosages hormonaux. La comparaison se fera pour tous les paramètres dosés versus les groupes contrôles et témoins.

Après dissection du cerveau de l'animal, on le place dans une balance de précision afin de déterminer sa masse.

2.7. Analyses statistiques :

L'analyse des résultats a été réalisée à l'aide du logiciel XLSTAT 2014 et Minitab17. Pour chacun des facteurs expérimentaux (comportementaux et biologiques), les résultats ont été traités par une analyse de variance (ANOVA) à deux et/ou à un facteur(s), les facteurs pouvant varier selon le test, mais le facteur obturation nasale (ON) étant toujours présent. Quoiqu'il en soit, dans la description des résultats de chaque test, le/les facteur(s) impliqué(s) sera/seront précisé(s), de même que le facteur F de l'analyse de variance, et le degré de significativité (noté p) y correspondant. Dans tous les cas, le seuil de significativité (p) a été fixé à 5% ; sur les figures, cette significativité a été représentée par une étoile lorsque la significativité était inférieure ou égale à 5% ($p \leq 0,05$), par deux étoiles lorsqu'elle était inférieure ou égale à 1% ($p \leq 0,01$), et par trois étoiles lorsqu'elle était inférieure ou égale à 0,1% ($p \leq 0,001$). Lorsque le degré de significativité était supérieur à 0,05, les résultats ont été considérés comme non significatifs (noté ns dans les tableaux).

RESULTATS

1. Comportement des rats après l'obturation nasale :

Au réveil de l'anesthésie, les rats obturés tentent avec leurs pattes antérieures, d'ouvrir leurs narines, mais en vain la cautérisation semble réussie. On remarque les signes cliniques suivants : Rythme cardiaque accéléré; respiration buccale, perte d'équilibre, agitation suivie d'une diminution de la mobilité, poils piqués. Le taux de mortalité des animaux exposés à l'obturation nasale, est présenté sous forme cumulée dans la figure 4, La majorité des jeunes meurent le 10^{ème} jour postnatal, soit 48h après la cautérisation des narines. À cet âge, le taux de mortalité cumulé est de 25% chez les femelles et de 28.571% chez les mâles. La mortalité augmente ensuite progressivement jusqu'au 13^{ème} jour postnatal chez les mâles et jusqu'au 14^{ème} jour postnatal chez les femelles avant de se stabiliser. Le 21^{ème} jour postnatal, le taux de mortalité cumulé est de 56.25% chez les femelles et de 57.143% 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'obturation nasale ($p=0.014$). À noter qu'aucune mortalité n'a été observée dans les lots témoins et contrôles au cours de la période d'observation.

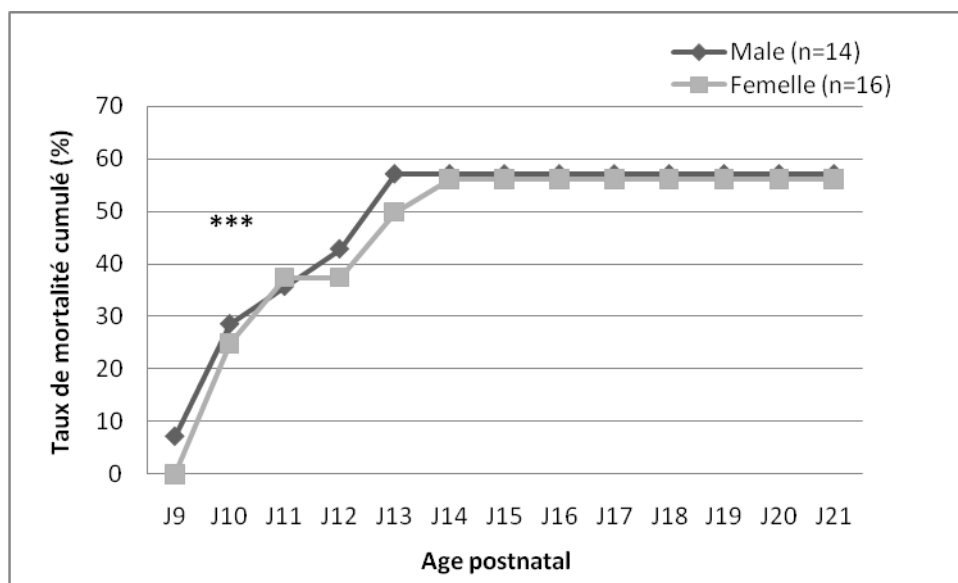
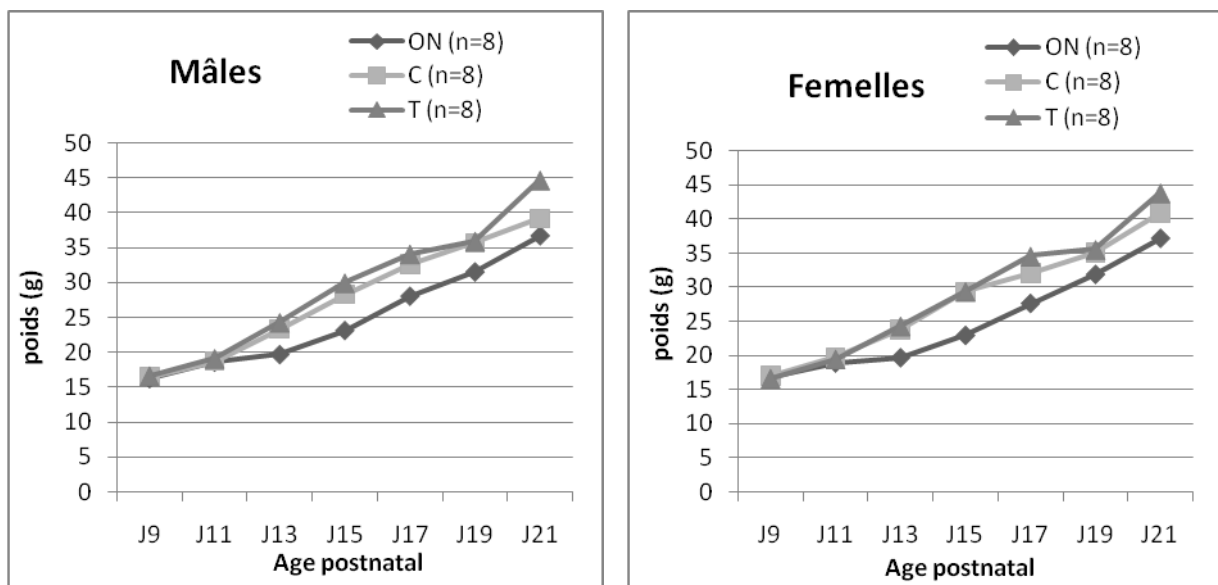


Figure 4 : Taux de mortalité (%) cumulé chez les animaux exposés à l'obturation nasale (n=30).

1.1. Croissance pondérale :

Nos résultats montrent que la croissance pondérale des individus diffère significativement en fonction du groupe expérimental ($F = 17,92, p < 0,0001$).

En effet, les animaux exposés à l'obturation nasale présentent une masse pondérale significativement plus faible à J15 que ce soit chez les femelles ($p = 0,000$ vs témoins; $p = 0,001$ vs contrôles) ou chez les mâles ($p = 0,001$ vs témoins; $p = 0,004$ vs contrôles). Cette disparité est reliée à une différence significative au niveau du gain pondéral sur la période J9 - J15 ($F = 18,97, p < 0,0001$). Les individus exposés à l'obturation 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 ($p < 0,0001$ chez les femelles; $p < 0,0001$ 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 ($F = 1,87, p = 0,33$).



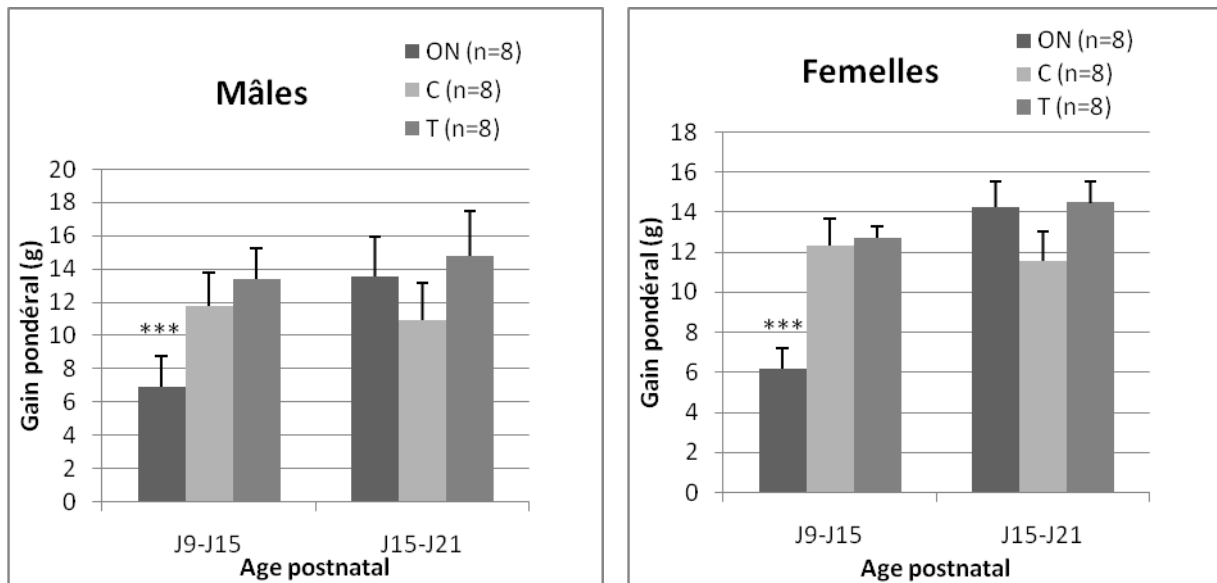


Figure 5 : Croissance pondérale (g) et gain pondéral (g) des animaux témoins, contrôles et obturation nasale entre le 9ème et le 21ème jour postnatal.

2. Paramètres comportementaux :

2.1. Open Field (test de champs ouvert) :

a) Temps passé au centre du dispositif :

D'après nos résultats on remarque que dans l'open Field, les rats passent moins de temps dans la zone centrale, les rats ON passent en moyenne à J9 ($3,231 \pm 1,223$) avec un maximum 4,16 s et un minimum de 1,50 s pour les mâles et pour les femelles ($2,33 \pm 0,582$) avec un maximum 6,795 s et un minimum de 0,528 s, les rats contrôles passent en moyenne ($4,211 \pm 2,087$) avec un maximum de 7,451 s et un minimum de 0,10 s pour les rats mâles et pour les femelles ($1,789 \pm 1,685$) avec un maximum de 3,859s et un minimum de 0,665s et pour les lots témoins mâles la moyenne est de ($3,62 \pm 1,212$) avec un maximum de 4.1 s et un minimum de 1,05 s et pour les femelles ($2,185 \pm 0,491$) avec un maximum de 3,651 s et un minimum de 1,825 s . L'analyse statistique montre qu'il n'y a pas de différence significative à J9, J15 et J21 entre les trois valeurs ($F=3,645$ et $P=0,114$) ceci représente un signe de moindre anxiété.

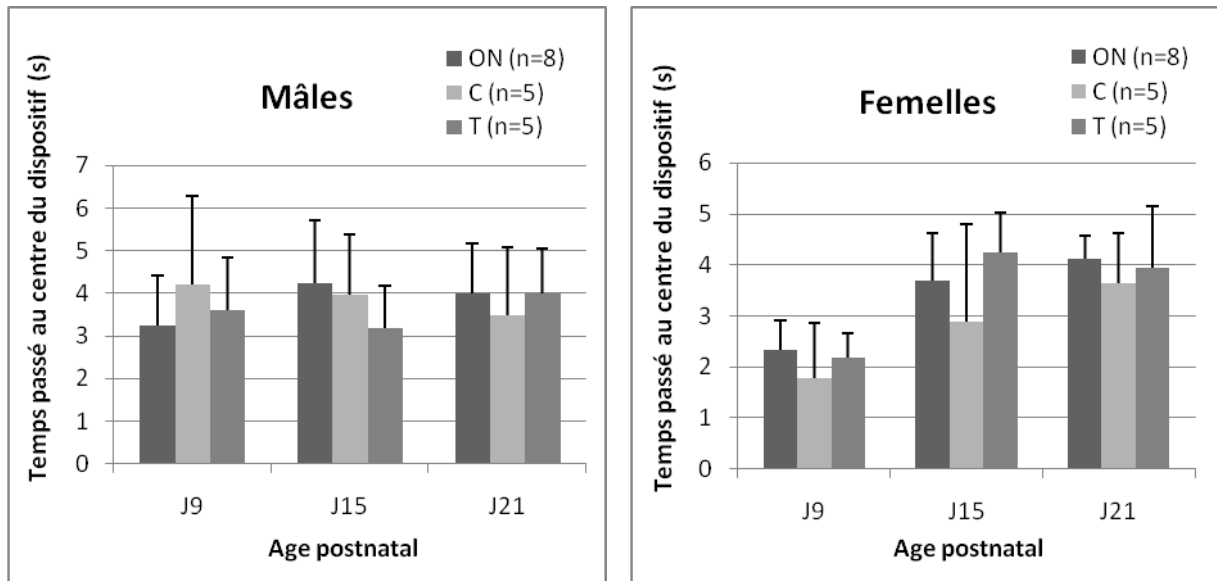


Figure 6 : Temps (s) passé au centre du dispositif Open Field pour les rats ON, contrôles et témoins.

b) Temps passé à la périphérie du dispositif :

Nous avons constaté que d'une session à l'autre les rats ON, contrôles et témoins passent quasiment le même temps dans la partie périphérique, représentées en moyenne de $(5,473 \pm 2,11)$ pour les rats ON mâles et $(17,475 \pm 1,984)$ pour les femelles, de $(8,524 \pm 3,22)$ pour les rats contrôles mâles et $(15,485 \pm 2,365)$ pour les femelles. Les rats témoins passent en moyenne $(4,56 \pm 1,859)$ pour les mâles et $(18,27 \pm 0,921)$ pour les femelles. L'analyse statistique montre qu'il n'y a aucune différence significative entre les trois valeurs à J9 ($F=14,87$; $P=0,31$), à J15 ($F=21,44$; $P=0,22$) et à J21 ($F=23,97$; $P=0,11$).

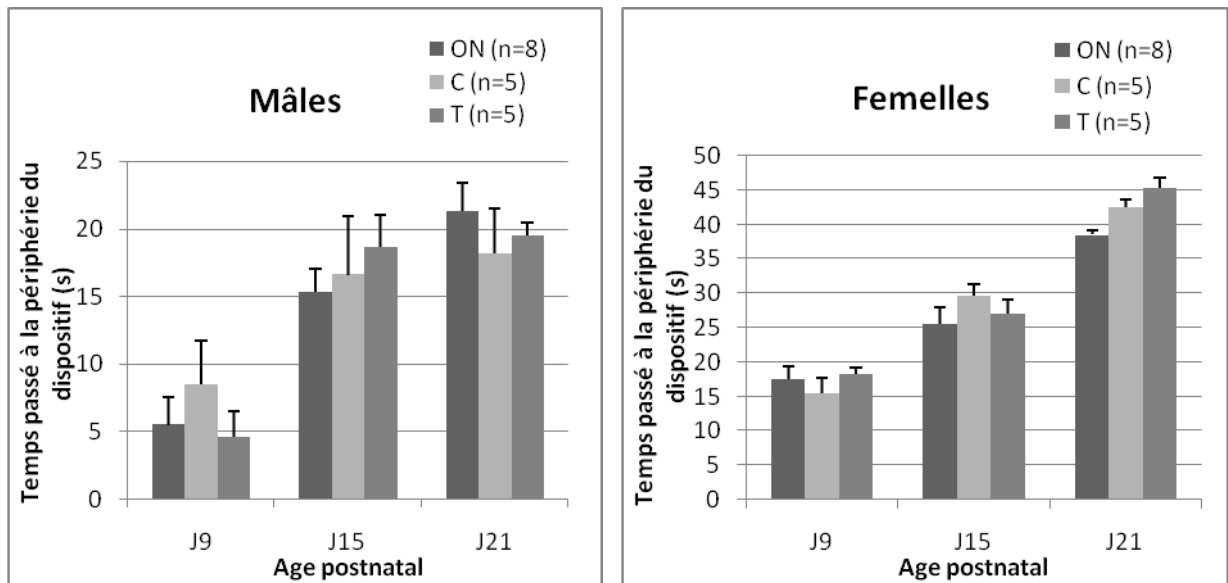


Figure 7 : Temps (s) passé à la périphérie du dispositif Open Field pour les rats ON, contrôles et témoins.

c) Temps passé à la bordure du dispositif :

Au niveau du temps passé à la bordure du dispositif, on remarque qu'il n'y a aucune différence significative quelque soit le groupe, le sexe et l'âge des rats, ($F=4,857$; $P=0,211$) à J9, ($F=6,598$; $P=0,320$) à J15 et ($F=4,354$; $P=0,149$) à J21 pour les mâles et pour ce qui est des femelles à J9 ($F=4,857$; $P=0,065$) , à J15 ($F=3,54$; $P=0,19$) et ($F=3,698$; $P=0,047$) à J21.

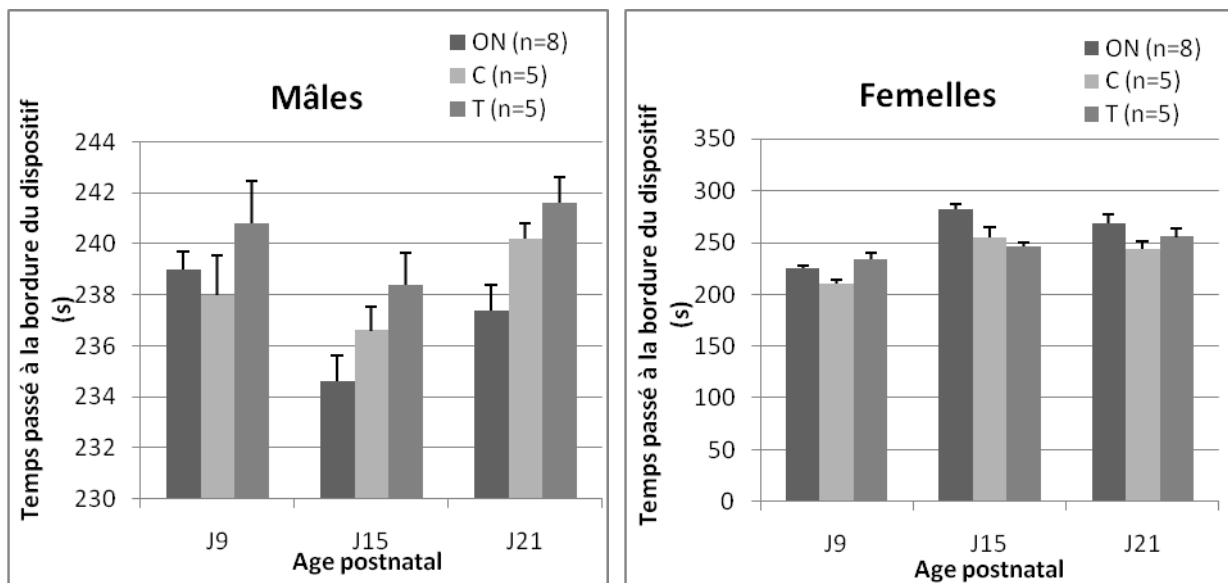
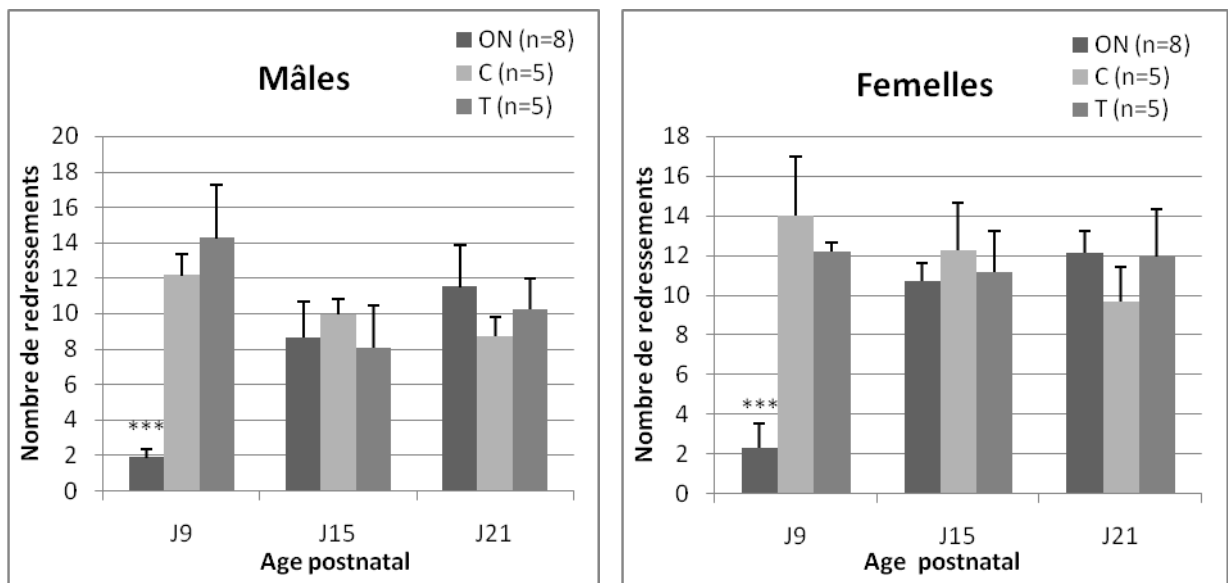


Figure 8 : Temps (s) passé à la bordure du dispositif Open Field pour les rats ON, contrôles et témoins.

d) Redressements et défécations :

Le nombre de redressements et de défécations dans le dispositif Open Field est représenté dans la figure 9, les valeurs affichées représentent la moyenne. On constate des différences hautement significatives entre les lots expérimentaux pour le nombre de redressements à J9 ($F= 7,94$, $P < 0,0001$) pour les mâles et ($F= 7,35$, $P < 0,0001$) pour les femelles. Quelque soit le sexe, Il n'y a en revanche aucune différence significative pour le nombre de redressements dans le dispositif à J15 et J21.

Pour le nombre de défécations, on enregistre des différences significatives entre les rats mâles traités, contrôles et témoins quoi qu'ils soient leur âge à J9 ($F=$, $P < 0,0001$), à J15 ($F=$, $P=0,03$) et à J21 ($F=$, $P=0,014$)



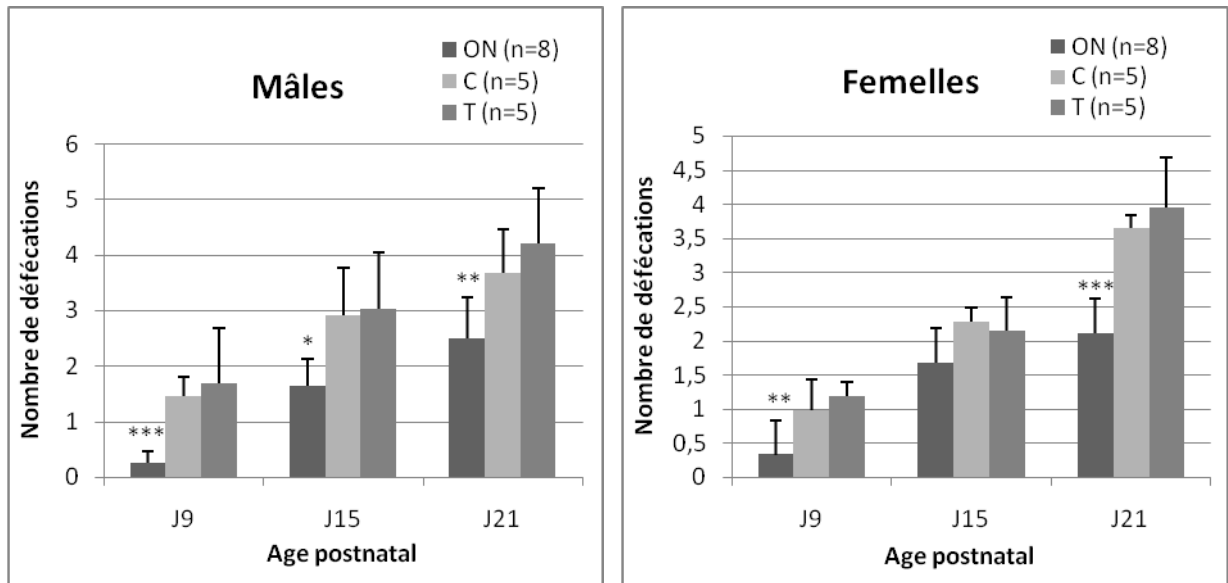


Figure 9 : Variations du nombre de redressements et de défécations entre les rats

ON, contrôles et témoins au niveau du dispositif Open Field.

2.2. Plus Maze (test de croix surélevée)

a) Temps passé au centre du dispositif :

D'après ces résultats on remarque que les rats ON mâles passent plus de temps au centre du dispositif Plus Maze à J9 avec une moyenne de $(282,229 \pm 1,699)$, les rats contrôles passent en moyenne $(29,090 \pm 3,959)$ et les témoins $(38,571 \pm 9,457)$. Il y a une différence hautement significative à J9 ($F=4,56$; $p < 0,0001$), à J15 et J21 aucune différence n'est enregistrée. Chez les femelles des trois lots expérimentaux, on ne note aucune différence significative à J9, J15 ou à J21 ($F=3,564$; $P=0,07$), ($F=4,854$; $P=0,084$) et ($F=12,854$; $P=0,16$).

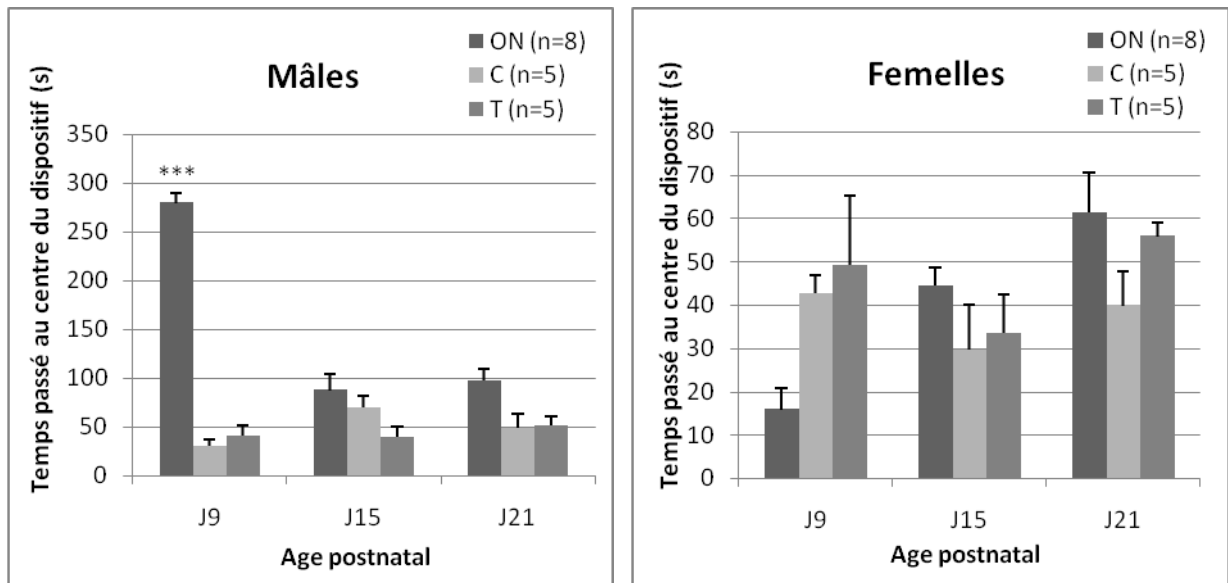


Figure 10 : Temps (s) passé au centre du dispositif Plus Maze pour les rats ON, contrôles et témoins.

b) Temps passé dans les bras fermés du dispositif :

L'analyse statistique montre qu'il y a une différence hautement significative entre les trois valeurs des lots expérimentaux. À J9 chez les mâles ($F= 154,321$; $P< 0,0001$), à J15 ($F= 52,187$; $P< 0,0001$) et ($F= 53,331$; $P< 0,0001$) à J21. Quasiment le même résultat obtenu chez les femelles ($F= 118,31$; $P< 0,0001$), à J15 ($F= 46,713$; $P< 0,0001$) et ($F= 43,47$; $P< 0,0001$) à J21. Ceci représente un signe d'anxiété chez les rats ON.

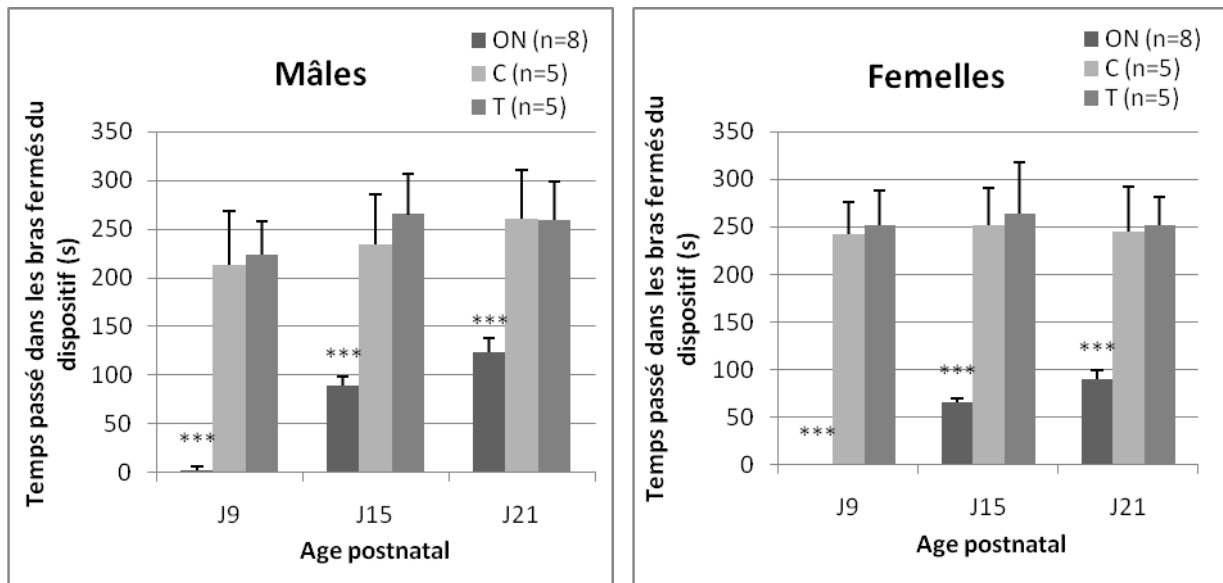


Figure 11 : Temps (s) passé aux bras fermés du dispositif Plus Maze pour les rats ON, contrôles et témoins.

c) Temps passé dans les bras ouverts du dispositif :

Nous avons remarqué que d'une session à l'autre les rats exposés à l'obturation nasales passent plus de temps dans les parties anxiogènes du dispositif par rapport aux contrôles et témoins, représentées par le temps passé dans les bras ouverts en moyenne ($274,529 \pm 16,569$) chez les femelles à J9. L'analyse statistique montre qu'il ya une différence hautement significative entre les trois valeurs ($F=18,48$; $P<0,0001$). A J 15 et J21 on enregistre des différences très significatives ($F=24,57$; $P=0,012$) et ($F=21,869$; $P=0,018$). Chez les mâles, on n'enregistre aucune différence significative au 9^{ème} jour postnatal ($F=9,297$; $p=0,208$). Quant au 15^{ème} et 21^{ème} jour, on note des différences significatives respectives entre les lots expérimentaux ($F=28,95$; $P=0,012$) et ($F=34,45$; $P=0,001$).

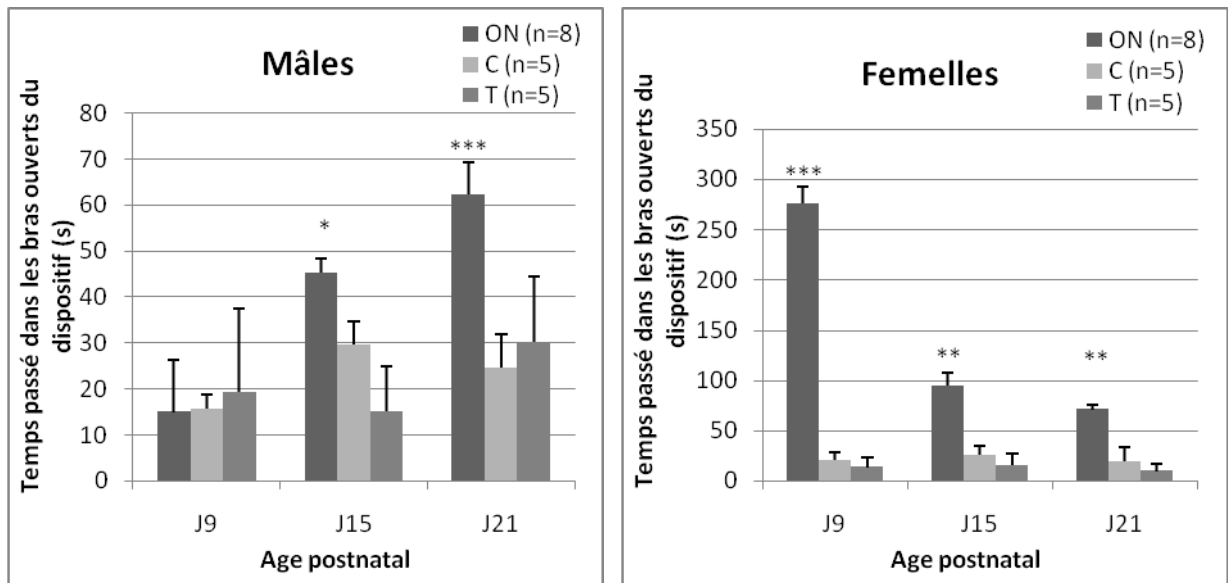


Figure 12 : Temps (s) passé aux bras ouverts du dispositif Plus Maze pour les rats ON, contrôles et témoins.

d) Redressements et défécations :

On a mesuré un nombre de redressements chez les rats contrôles et témoins très élevé, dont la moyenne à J9 est de $(23,571 \pm 0,24)$ et $(25,271 \pm 0,41)$ chez les mâles alors que chez les rats ON, elle est de $(7,712 \pm 0,36)$. Il y a une différence hautement significative entre les trois valeurs à J9 ($F=14,79$; $P<0,0001$) et à J15 ($F=9,547$; $P<0,0001$) pour les mâles et pour les femelles à J9 ($F=17,75$; $P<0,0001$) et à J15 ($F=11,57$; $P<0,0001$). Aucune différence significative à enregistrer à J21 que ce soit chez les mâles ou chez les femelles des lots expérimentaux. Quelque soit l'âge, le sexe et le groupe des individus on remarque aucune différence significative pour le nombre de défécation. Le marquage du territoire est un comportement inné chez l'ensemble des rongeurs et ne semble pas être altéré par les modifications de l'environnement.

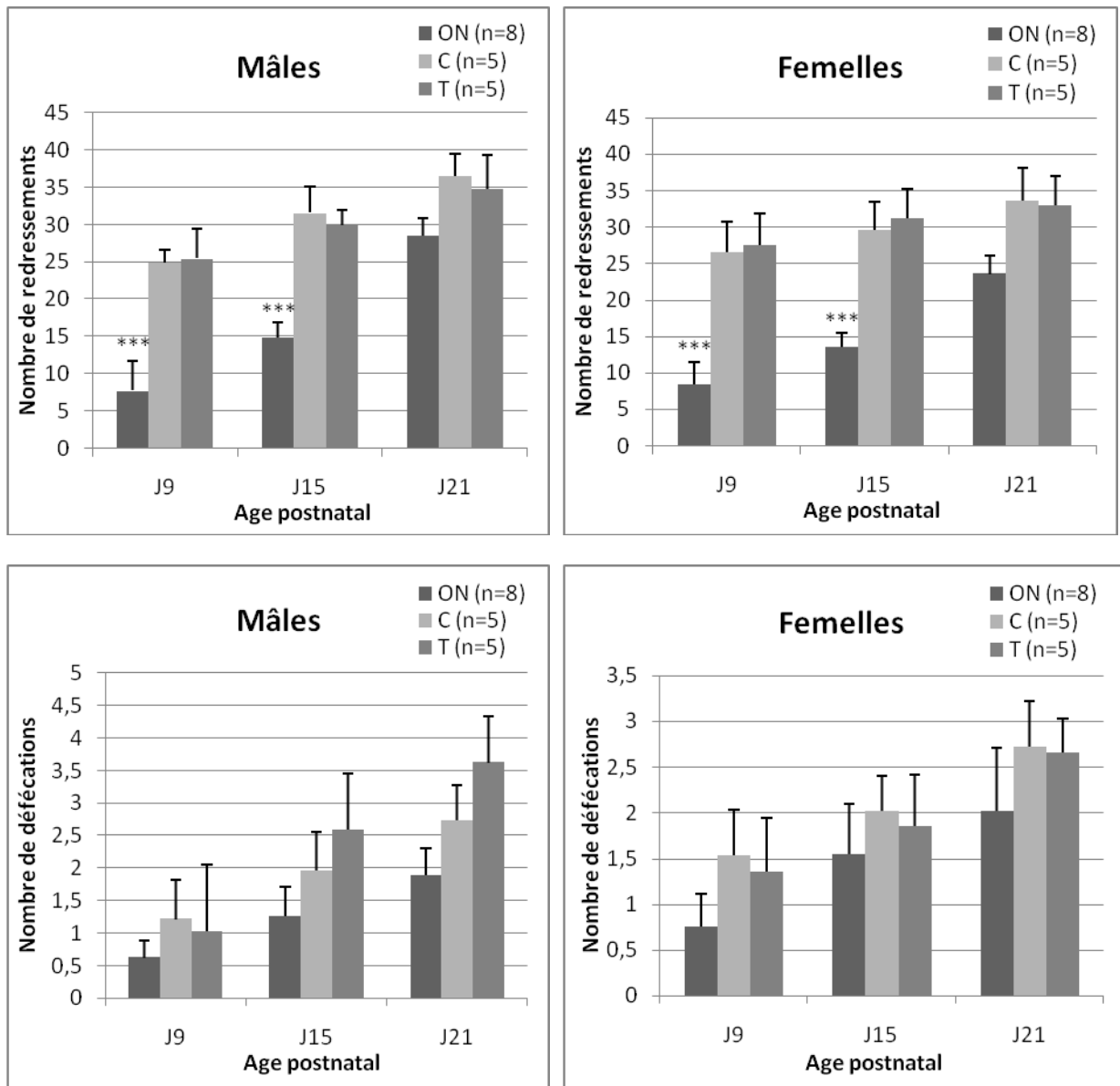


Figure 13 : Variations du nombre de redressements et de défécations entre les rats

ON, contrôles et témoins au niveau du dispositif Plus Maze.

2.3. Reconnaissance olfactive :

a) Temps de latence avant d'effectuer un choix « sciure propre x sciure nid » :

Vingt-quatre heures après le traitement, les animaux exposés à l'obturation nasale mettent significativement plus de temps pour effectuer un choix ($124,55 \pm 20,93$) chez les mâles ;

163,76±29,42 chez les femelles) que les jeunes témoins (27,7±2,97 chez les mâles; 12,6±3,55 chez les femelles) et contrôles (18,28±6,84 chez les mâles; 15,52±8,64 chez les femelles) (F=18,242 ; P<0.0001 chez les mâles et F=18,708 ; P<0,0001 chez les femelles). Cette différence tend à disparaître à J15 et J21. En effet, le 15^{ème} jour postnatal chez les mâles (F=16,28 ; P=0,029) et (F=12,96 ; P=0,034) chez les femelles et au 21^{ème} jour postnatal chez les mâles (F=14,54 ; P=0,29), (F=13,69 ; P=0,16) chez les femelles.

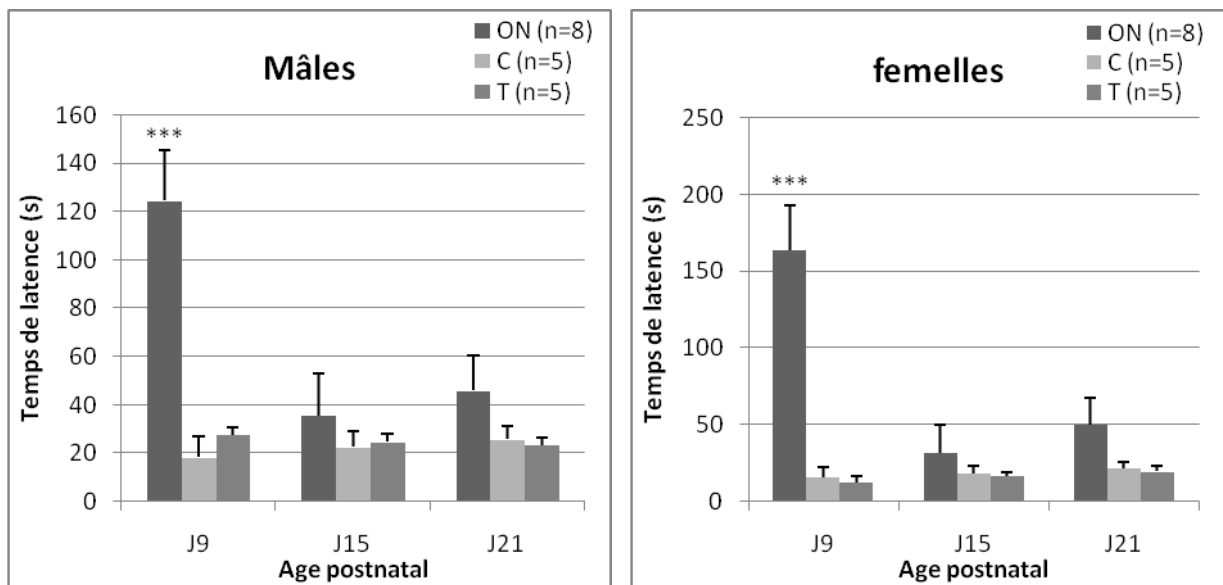


Figure 14 : Temps (s) de latence avant d'effectuer un choix chez les animaux exposés à une obturation nasale, contrôles et témoins au test « sciure propre x sciure nid ».

b) Choix du compartiment à sciure propre :

Le temps passé dans chaque type de sciure diffère de façon significative selon les groupes expérimentaux. Pour le compartiment à « sciure propre », que ce soit chez les mâles ou les femelles des lots contrôles et témoins, on enregistre un temps très minime voire inexistant à J9, J15 et J21. Alors que les jeunes exposés à l'obturation nasale réalisent un choix proche du choix aléatoire (choix de la sciure propre) où ils passent le plus de temps, il est maximal à J9 que ce soit chez les mâles (210,625±3,95) ou chez les femelles (180,45±5,24), puis tend à se

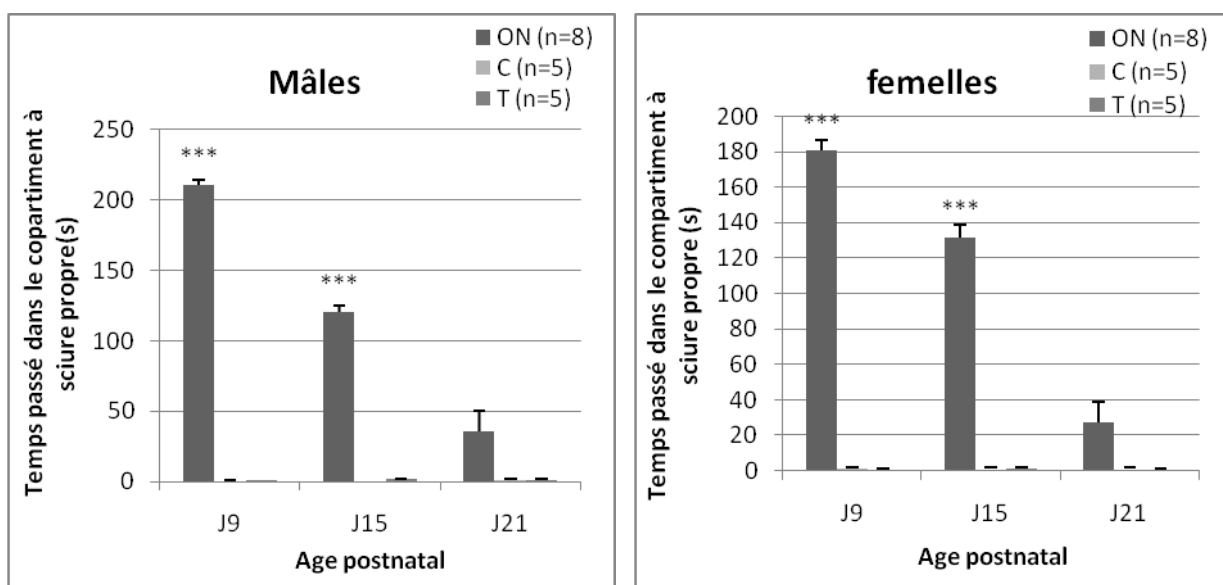
réduire à J15, chez les mâles ($120,45 \pm 4,56$) et ($131,54 \pm 4,52$) chez les femelles et à J21 chez les mâles ($35,89 \pm 3,954$) et ($27,34 \pm 13,44$) chez les femelles. Quelque le sexe des individus ON à J9 et J15, on note des différences hautement significatives $p < 0,0001$ vs contrôles et témoins. A J21 $p = 0,13$ chez les mâles et $p = 0,21$ chez les femelles.

c) Choix du compartiment à sciure nid :

Le temps passé dans le compartiment à « sciure nid » est significativement plus faible chez les individus ON que chez les individus contrôles et témoins. A J9 la moyenne est de ($12,54 \pm 3,94$) chez les mâles et ($21,54 \pm 4,21$) chez les femelles alors que chez les animaux contrôles et témoins, elle est beaucoup plus supérieure ($P < 0,0001$). A J15, on enregistre une différence hautement significative chez les mâles ($F = 19,27$; $p < 0,0001$) et chez les femelles ($F = 18,12$; $p < 0,0001$).

Il n'y a plus aucune différence significative à J21 ($F = 24,47$; $p = 0,34$) chez les mâles et ($F = 29,31$; $p = 0,45$) chez les femelles.

Les individus témoins et contrôles distribuent leur temps de manière similaire indépendamment de leur âge ou de leur sexe ($0,117 < P < 0,984$).



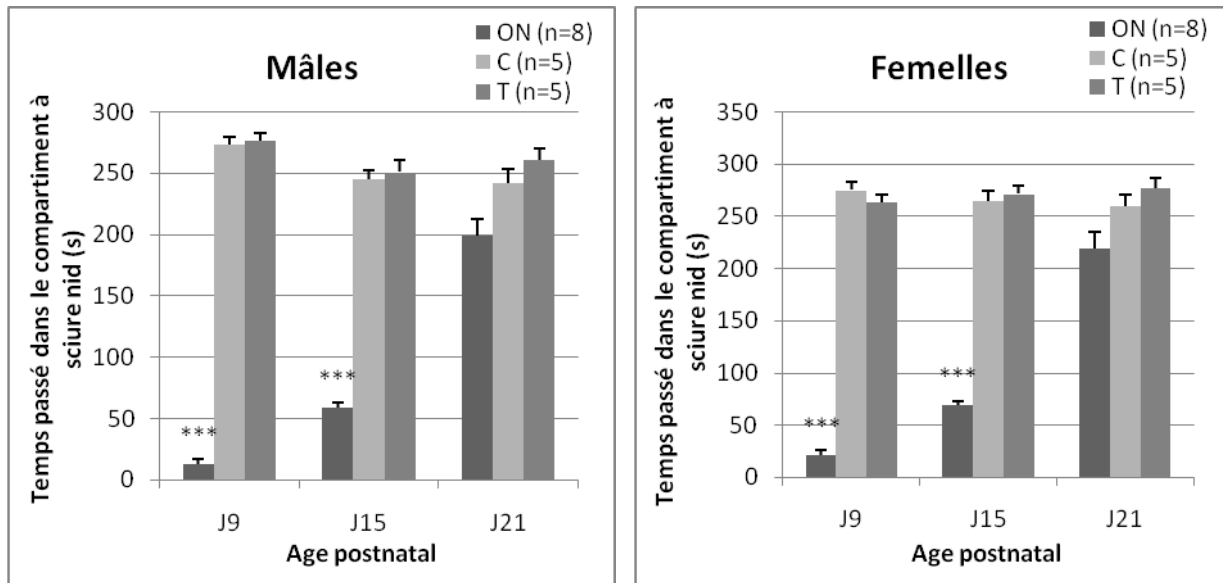


Figure 15 : Variations du temps (s) passé dans chaque compartiment dans le cadre du test « sciure propre x sciure nid » entre les rats ON, contrôles et témoins.

3. Paramètres biologiques :

3.1. Glycémie

Chez les animaux ON, la glycémie diminue considérablement 24h après l'obturation des narines et atteint une valeur de $(0,41 \pm 0,098)$ chez les mâles et de $(0,34 \pm 0,055)$ chez les femelles. Cette chute de glycémie est hautement significative ($p < 0,0001$ vs témoins et contrôles). Chez les femelles, l'hypoglycémie se maintient jusqu'à J15 $(0,49 \pm 0,14)$ et se déclare très significative ($p=0,012$). Alors que chez les mâles, on n'enregistre aucune différence significative. A J21, les taux de glycémie sont comparables à ceux des rats témoins et contrôles que ce soit chez les mâles $(0,92 \pm 0,04)$ ou chez les femelles $(1,13 \pm 0,034)$.

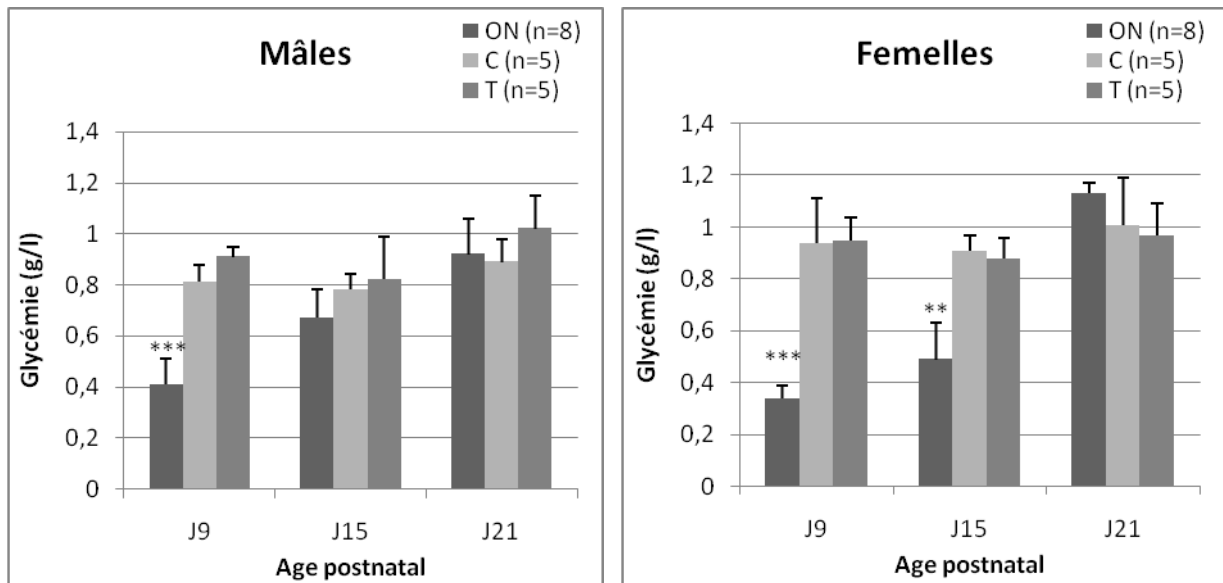


Figure 16 : Valeurs moyennes du glucose sanguin (g/l) chez les Rats ON, contrôles et témoins.

3.2. Variations du taux d'ACTH :

Concernant la concentration plasmatique en ACTH, une différence significative entre les groupes expérimentaux est détectée à J9 ($F = 23,60$; $p < 0,0001$), J15 ($F = 27,41$; $p < 0,0001$) et J21 ($F = 7,96$; $p = 0,02$). Quel que soit leur âge, les individus témoins et contrôles présentent une concentration en ACTH comparable aussi bien chez les femelles que chez les mâles ($0,36 < p < 0,87$). Les animaux exposés à l'obturation nasale affichent au contraire une augmentation significative du taux d'ACTH plasmatique. Chez les femelles, cette élévation est observée 24h après le traitement (J9 : $p < 0,0001$ vs témoins et contrôles), à la fin de la période d'obturation nasale (J15 : $p < 0,0001$ vs témoins et contrôles) et se maintient jusqu'au 21ème jour postnatal ($p < 0,0001$ vs témoins et contrôles). Chez les mâles, l'augmentation est significative à J9 ($p = 0,0003$ vs témoins; $p = 0,0001$ vs contrôles) et J15 ($p = 0,0004$ vs témoins; $p = 0,0002$ vs contrôles) mais pas à J21 ($p = 0,19$ vs témoins; $p = 0,14$ vs contrôles).

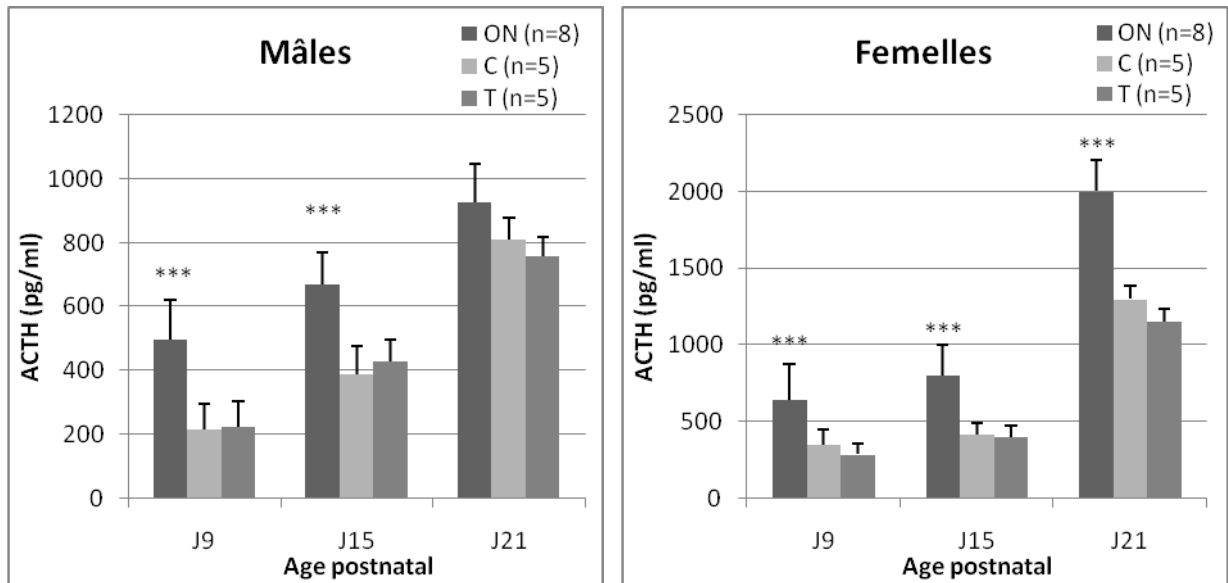


Figure 17 : Variations du taux d'ACTH plasmatique (pg/ml) entre les groupes expérimentaux.

3.3. FNS

L'effet de l'obturation nasale sur les paramètres hématologique chez les rats est présenté dans les tableaux 1 et 2. Les résultats indiquent que sur quelques paramètres mesurés à différentes périodes de l'expérimentation (J9, J15 et J21), seulement deux ont varié de manière significative. Chez les mâles, des variations très significatives sont observés au niveau des lymphocytes à J9 ($74,7 \pm 5,22$) contre ($65,4 \pm 5,21$) pour les contrôles et ($62,3 \pm 1,21$) pour les témoins, à J15 ($86 \pm 2,22$) contre ($71,12 \pm 5,01$) pour les contrôles et ($73,51 \pm 0,8$) pour les témoins et à J21 ($84,2 \pm 2,97$) contre ($75,1 \pm 2,14$) pour les contrôles et ($69,4 \pm 1,55$) pour les témoins. Des concentrations globulaires moyennes en monocytes significatives seulement à J9 ($2,8 \pm 0,19$) contre ($6,55 \pm 0,55$) pour les contrôles et ($8,15 \pm 0,02$) pour les témoins.

Tableau 1: Evaluation des paramètres hématologiques des rats expérimentaux mâles à J9, J15 et J21.

Age postnatal	J9			J15			J21			p
Groupes	ON(n=8)	C(n=5)	T(n=5)	ON(n=8)	C(n=5)	T(n=5)	ON(n=8)	C(n=5)	T(n=5)	
FNS										
GB (10 ³ /ul)	6,37±0,37	7,1±0,25	6,95±1,28	7,37±0,67	8,4±0,05	7,56±0,2	8,79±1,02	9,45±2,45	7,48±0,9	0,32 ns
GR (10 ⁶ /ul)	8,94±0,95	9,71±1,05	8,29±1,87	11,24±0,7	10,8±1,47	8,32±0,09	10,29±0,3	11,54±1,8	9,70±0,11	0,46 ns
NEUT (%)	20,1±2,53	18,1±1,44	17,25±2,3	26±1,54	24,54±5,02	25,32±3,1	36,3±3,25	34,47±2,1	32,3±4,97	0,34ns
LYMPH (%)	74,7±5,22	65,4±5,21	62,3±1,21	86±2,22	71,12±5,01	73,51±0,8	84,2±2,97	75,1±2,14	69,4±1,55	0,017 **
MONO (%)	2,8±0,19	6,55±0,55	8,15±0,02	6,5±0,14	7,78±0,51	8,14±1,12	8,1±0,51	6,97±0,09	7,1±1,34	0,041 *
EO (%)	2,4±0,33	2,14±0,5	1,87±1,02	1,5±0,21	1,69±0,45	2,01±0,08	1,3±0,44	1,8±0,05	1,2±0,14	0,8ns

Les valeurs des paramètres hématologiques (tableau2) chez les rats indiquent que chez les femelles, l'obturation nasale a modifié de manière très significative les globules blancs à J15 (6,82±0,01) contre (12,3±2,14) pour le lot contrôle et (13,54±5,1) pour le lot témoin. Cette modification se maintient jusqu'à J21 (5,69±0,12) contre (9,97±1,45) pour le groupe contrôle (12,54±4,2) pour le groupe témoin. Les paramètres hématologiques mesurés ont montré des variations hautement significatives au niveau des taux de lymphocytes, on enregistre à J9 un taux de (43,3±5,01) pour le groupe ON, de (35,84±2,7) pour le groupe contrôle et de (37,85±1,5) pour le groupe témoin, à J15 le taux de lymphocytes des rattes ON est de (61,7±8,54), de (49,8±11,21) chez les rattes contrôles et de (51,21±9,2) chez les rattes témoins. À J21, on note des variations pour les ON de (76,7±2,87) contre (45,5±5,1) pour les contrôles et (40,2±7,5) pour les témoins.

Tableau 2: Evaluation des paramètres hématologiques des rats expérimentaux femelles à J9, J15 et J21.

Age postnatal	J9			J15			J21			<i>p</i>
Groupes	ON(n=8)	C(n=5)	T(n=5)	ON(n=8)	C(n=5)	T(n=5)	ON(n=8)	C(n=5)	T(n=5)	
FNS										
GB (10 ³ /ul)	9,60±0,05	11,54±2,3	10,54±0,2	6,82±0,01	12,3±2,14	13,54±5,1	5,69±0,12	9,97±1,45	12,54±4,2	0,032 **
GR (10 ⁶ /ul)	9,74±1,21	8,78±3,25	10,54±0,9	8,88±1,21	9,32±2,01	9,45±3,12	10,44±0,4	9,47±0,19	10,61±1,7	0,445 ns
NEUT (%)	27,7±0,21	23,54±2,1	26,21±5,8	52,8±3,77	52,14±9,54	49,56±8,1	44,6±5,41	55,98±2,2	60,7±6,14	0,13 ns
LYMPH (%)	43,3±5,01	35,84±2,7	37,85±1,5	61,7±8,54	49,8±11,21	51,21±9,2	76,7±2,87	45,5±5,1	40,2±7,5	0,009 ***
MONO (%)	4,3±0,22	5,1±0,27	6,7±5,12	7,1±4,14	6,22±0,47	4,98±0,25	7,6±0,06	6,12±4,11	4,8±2,14	0,2ns
EO (%)	0,1±0,04	1,14±0,17	0,9±0,01	1,2±1,27	1,5±0,45	1,37±0,58	0,9±0,19	1,44±0,48	1,2±0,33	0,6ns

3.4. Dosage de la testostérone et de la progestérone :

Concernant la concentration plasmatique en testostérone, les animaux exposés à l'obturation nasale affichent une diminution significative ($p=0,031$) du taux de testostérone à J9 ($0,025\pm0,07$) vs contrôles ($0,21\pm0,15$) et témoins ($0,18\pm0,13$). La même tendance statistique est observée à J15, la diminution est hautement significative ($p=0,001$) ($0,03\pm0,23$) pour les ON contre ($1,15\pm0,27$) pour les contrôles et ($1,24\pm0,15$) pour les témoins. Aucune différence significative à enregistrer à J21 ($p=0,41$).

Chez les femelles, la diminution de la concentration plasmatique en progestérone est très significative à J9 ($p=0,022$), on enregistre une moyenne de ($9,76\pm1,54$) chez les rattes ON, de ($22,15\pm2,98$) chez les contrôles et de ($20,54\pm4,32$) chez les témoins. La baisse de la concentration plasmatique en progestérone se maintient jusqu'à la fin de la période

d'obturation nasale (J15), la différence entre les trois lots expérimentaux est hautement significative ($p < 0,0001$), la moyenne est de ($11,83 \pm 2,03$) chez les femelles exposées à l'obturation nasale, de ($34,87 \pm 1,95$) chez les femelles contrôles et de ($41,21 \pm 4,32$) chez les femelles témoins. Au 21^{ème} jour postnatal, aucune différence significative n'est détectée entre les différents lots expérimentaux ($p = 0,52$).

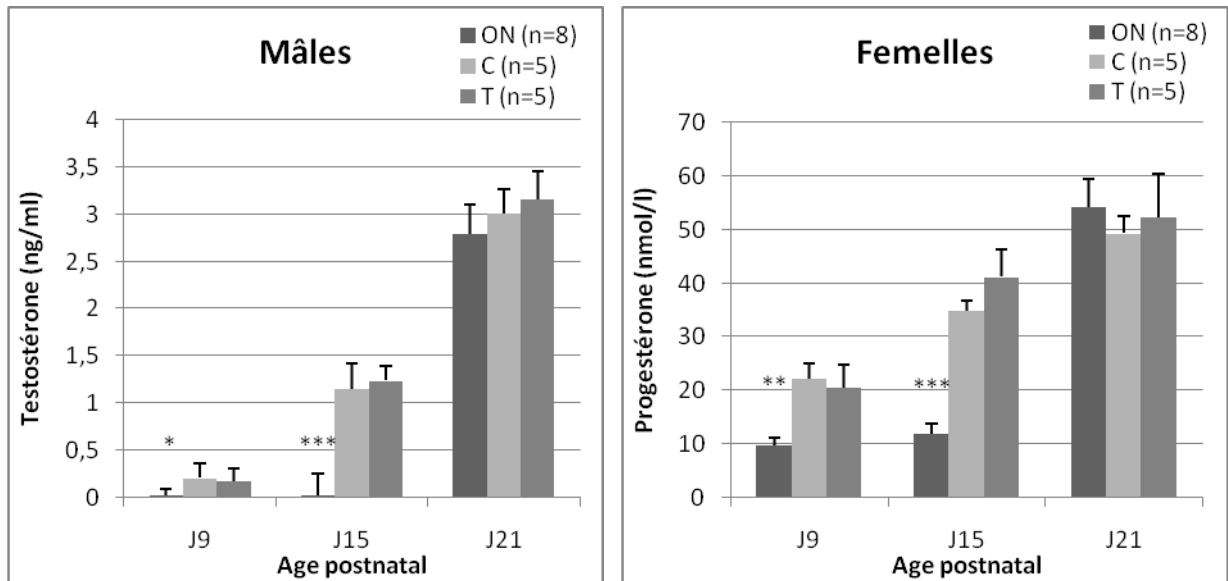


Figure 18 : Dosage de testostérone (ng/ml) et de progestérone (nmol/l) des groupes expérimentaux.

4. Evaluation de la masse du cerveau :

La figure montre que l'obturation nasale est associée à des modifications de la masse spécifique du cerveau à J15 ($p < 0,0001$) que ce soit chez les mâles ou chez les femelles. Ainsi à J21 ($p = 0,039$) chez les mâles et ($p = 0,013$) chez les femelles. 24h après le traitement (J9), la masse du cerveau n'est pas modifiée par l'obturation nasale ($p = 0,74$) chez les mâles et ($p = 0,63$) chez les femelles. A J15, on constate une atrophie du cerveau touchant aussi bien les mâles ($0,35 \pm 0,12$) vs contrôles ($1,09 \pm 0,05$) et témoins ($1,14 \pm 0,11$) que les femelles ($0,37 \pm 0,17$) vs contrôles ($1,12 \pm 0,14$) et témoins ($1,17 \pm 0,13$). A J21, les masses du cerveau restent atrophiées, chez les mâles, les individus exposés à l'obturation nasale présentent une

masse du cerveau ($0,89\pm 0,12$) significativement inférieure ($p=0,032$) à celle des individus contrôles ($1,31\pm 0,142$) et témoins ($1,26\pm 0,04$). Ainsi leurs homologues femelles ON ($0,78\pm 0,14$), on enregistre une différence très significative ($p=0,023$) par rapport aux individus contrôles ($1,28\pm 0,09$) et témoins ($1,33\pm 0,08$).

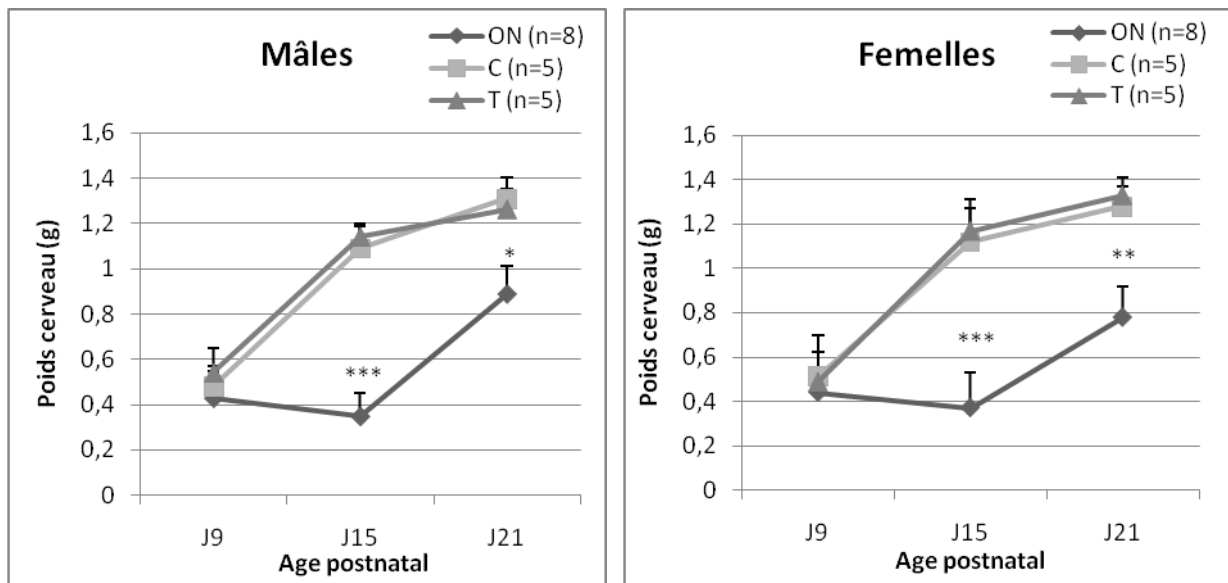


Figure 19 : Poids moyen (g) du cerveau chez les ratons ON, contrôles et témoins.

DISCUSSION

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 : la privation olfactive peut être d'origine congénitale, tumorale, inflammatoire ou traumatique (Raji *et al.*, 2001).

L'obturation bilatérale se traduit par une absence de respiration nasale, une telle modification devrait 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 rat. 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).

Un monde sans odeurs nous semble amoindri, au point qu'une anosmie acquise entraîne souvent une dépression sévère (Duchamp-Viret, 2012).

Chez cet animal, l'odorat représente la modalité sensorielle dominante (Slotnick, 2001). Les renseignements portés par l'odeur concernent aussi bien la localisation de la nourriture, l'évitement de dangers ou la communication entre les individus (pour revue Doty, 1986). Par exemple, la reconnaissance mère-jeune chez la brebis qui vient de mettre bas, est un apprentissage basé essentiellement sur les odeurs (Lévy et al, 1983). De même, les lapins nouveau-nés s'orientent préférentiellement vers l'odeur du lait de leur propre mère (Coureau et al, 2001). Chez les rats adultes également, le comportement alimentaire peut être modifié par les interactions sociales. En effet, un animal peut apprendre qu'une nourriture n'est pas dangereuse après avoir senti son odeur dans l'haleine d'un congénère démonstrateur. Au cours d'un test de choix en absence de tout contact social, le rat sujet préférera la nourriture portant l'odeur qu'il a sentie au contact du démonstrateur (Galef et Wigmore 1983).

Dans notre étude la procédure de cautérisation des narines induit une obturation nasale complète du 8^{ème} au 13^{ème} jour postnatal. Les narines s'ouvrent ensuite de façon significative au cours des 14^{ème} et 15^{ème} jours postnatals. Le choix des 9^{ème}, 15^{ème} et 21^{ème} 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).

Les animaux exposés à l'obturation nasale présentent un taux de mortalité élevé qui survient essentiellement à J10, c'est-à-dire 48h après la cautérisation des narines. Le taux de mortalité augmente progressivement jusqu'à J14 et J13 avant de se stabiliser autour de 56% et 57% à partir du moment où les narines commencent à s'ouvrir. La détresse respiratoire induite par

l'obturation 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'obturation 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 O₂ 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. Une forte réduction de l'apport énergétique pourrait donc être impliquée dans la mortalité élevée des animaux exposés à l'obstruction nasale. Quoiqu'il en soit, ce taux de mortalité important ne provient pas d'une inhibition du comportement maternel qui semble, au contraire, exacerbé.

La procédure de cautérisation des narines entraîne six jours d'obturation nasale complète. Cette obturation se traduit par un fort taux de mortalité qui ne provient pas d'une inhibition du

comportement maternel. Quoi qu'il en soit, l'obturation nasale devrait se traduire par une hyposmie susceptible de perturber la mise en place des comportements précoces tels que l'acquisition du comportement exploratoire.

La prise alimentaire est fortement affectée par l'obturation nasale. En effet, 24h après le traitement, les portées exposées à l'obturation nasale présentent une plus grande latence du premier évènement alimentaire. 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^{ème} 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 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'obturation 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'obturation nasale est de nouveau comparable à celle des animaux témoins et contrôles.

Seize rats exposés à l'obturation nasale, dix contrôles, et dix témoins, âgés de 9,15 et 21 jours, ont été testés dans l'openfield. Pour aucun des paramètres mesurés une différence significative n'a été trouvée entre les trois groupes expérimentaux.

Comme nous avons pu le constater, les rats juvéniles ON, n'ont pas développé d'anxiété particulière dans ce test de champs ouvert. Les valeurs obtenues pour le temps passé au centre, à la périphérie et à la bordure étaient d'ailleurs du même ordre de grandeur que celles obtenues chez les juvéniles contrôles et témoins ; le nombre de redressements était significativement inférieur à J9 chez les deux sexes, et celui des défécations se maintient à un niveau inférieur jusqu'à J21. La principale hypothèse qui peut être émise est que les rats ON

développent une anxiété particulière visible dans le test de l'open-field à travers le nombre de redressements et de défécations enregistrés.

Le test de labyrinthe en croix surélevée évalue l'état émotionnel des animaux face à l'obturation nasale. La majorité des rats mâles ON demeure immobiles au centre du dispositif à J9, ce qui explique un état d'extrême anxiété. À J15 et J21 ils rejoignent leurs homologues femelles où ils passent significativement plus de temps dans les bras ouverts du labyrinthe par rapport aux groupes témoins et contrôles. Cette réaction comportementale a également été mise en évidence dans des modèles dits « de dépression » chez le rongeur.

Nos résultats montrent que l'obturation 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'obturation nasale présentent un taux de retour au nid plus faible. Ces animaux réalisent également des choix aléatoires 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, la 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, la différence observée pour le temps de latence est totalement abrogée 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

dépît 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.

Par ailleurs, nos résultats révèlent que les animaux exposés à l'obturation nasale visitent moins le compartiment familier 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'obturation 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'obturation 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'obturation 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.

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).

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'obturation 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. L'hyposmie et l'anxiété constituent deux paramètres interconnectés susceptibles d'expliquer les modifications comportementales observées suite à l'induction de l'obturation nasale.

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^{ème} 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 (toilettage, 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'obturation 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.

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).

Comme l'ont montré de nombreuses études, bien qu'élevé loin de son environnement « naturel », le rat de laboratoire est particulièrement adroit pour « manipuler » les indices olfactifs et capables de résoudre des tâches même complexes, opérantes ou non, basées uniquement sur des odeurs (pour une revue voir Slotnick 2001).

Enfin, les animaux sont capables de retenir ces apprentissages sur de longues durées puisqu'ils montrent un souvenir quasi parfait pour un jeu d'odeurs appris plus de 30 jours auparavant (Slotnick 2001).

Chez le rat Wistar exposé à l'obturation nasale, la perte de poids est couplée à une hypoglycémie qui perdure jusqu'à la réouverture des narines. Notre étude démontre également une augmentation significative du taux d'ACTH qui se maintient même à J21 chez les femelles. Les variations du milieu extérieur sont triées et « ressenties » essentiellement par le système limbique qui envoie ces informations à l'hypothalamus par l'intermédiaire de nombreuses connections nerveuses (Gray *et al.*, 1989). Un stress aigu augmente l'amplitude et la synchronisation des pulsations de CRF et d'AVP vers l'hypophyse. Le pic d'ACTH qui en résulte induit alors la synthèse de glucocorticoïdes par les glandes surrénales. Selon la nature, l'intensité et la durée du stress, d'autres facteurs tels que l'angiotensine II ou des cytokines peuvent potentialiser l'action sécrétoire des différents intervenants de l'axe corticotrope (Chrousos, 1995). Le rétrocontrôle négatif exercé par les glucocorticoïdes sur les différents

étages de l'axe corticotrope permet ensuite l'extinction du pic de sécrétion mis en jeu en réponse au stresser.

En effet, en l'absence de stimulation sensorielle, on constate une diminution de la concentration plasmatique en testostérone et en progestérone chez les rats exposés à l'obturation nasale. Les phéromones et les systèmes olfactifs, innés, permettent la réalisation sans apprentissages de la partie initiale du comportement de reproduction (phase motivationnelle ou appétitive). Concrètement, les signaux olfactifs contrôlent la reconnaissance du partenaire du sexe opposé (hétérosexualité), puis le rapprochement physique des partenaires (motivation sexuelle) (Keller & Bakker, 2009).

Il existe plusieurs systèmes olfactifs innés et spécialisés. Le système olfactif principal (muqueuse olfactive + bulbes olfactifs principaux) et le système voméronasal (organe voméronasal + bulbes olfactifs accessoires) jouent un rôle majeur dans le contrôle du comportement sexuel. Les phéromones sexuelles sont perçues en particulier par l'organe voméronasal, puis le signal phéromonal est transmis par des circuits innés dans les structures hypothalamiques qui contrôlent la reproduction.

Les animaux sociaux peuvent faire preuve de capacités de discrimination et de reconnaissance, qui concernent leur espèce, leur groupe social ou leur apparentement, et même de capacités cognitives complexes de reconnaissance individuelle. Une des modalités sensorielles utilisées dans la communication sociale peut permettre la reconnaissance de parentèle. Par exemple, Hepper (1983) a montré que les rats pouvaient reconnaître leurs apparentés dans un olfactomètre.

La reconnaissance de la proximité génétique va se faire à plusieurs niveaux : l'espèce, la famille. Elle va permettre à un individu d'économiser de l'énergie en limitant certains types de communication aux individus concernés.

Il est important pour un individu d'être capable de reconnaître si un autre individu fait partie de son espèce ou non. Cela lui évite de gaspiller de l'énergie dans une communication vouée à l'échec, et permet également d'éviter les prédateurs.

Dans une étude, on a testé la capacité de discrimination entre les signatures olfactives individuelles par un mâle de l'espèce *Mus spicilegus* vis-à-vis de deux mâles de la même espèce, et de deux mâles de l'espèce *Mus musculus domesticus*, par un test d'habituation-déshabituaiton (Gouat et al., 1998). Le test d'habituation-déshabituaiton consiste à présenter la signature olfactive d'un individu à quatre reprises à une souris mâle *Mus spicilegus*, puis à changer de donneur la cinquième fois. Lors de chaque test on présente une coupelle contenant de la sciure propre, et une deuxième coupelle contenant de la sciure souillée (signature olfactive), et on mesure la durée de flairage. Le flairage de la coupelle souillée diminue du premier au quatrième test, puis il augmente au cinquième test si la souris détecte le changement de donneur. Dans le cas de cette expérience, la durée lors du cinquième test augmente quand les animaux donneurs sont de la même espèce que la souris testée, et n'augmente pas sinon. Il en a conclu que le mâle *Mus spicilegus* va discriminer entre deux mâles de son espèce mais pas entre deux mâles d'une autre espèce. Cette absence de discrimination individuelle pourrait avoir deux origines : soit la reconnaissance individuelle ne se fait pas, soit elle se fait mais la valeur attractive du signal est trop faible pour entraîner une réponse comportementale (Levy et al, 2004).

Une seconde étude montre que c'est la deuxième hypothèse qui est la plus probable. Une brève exposition (24h maximum) avec un congénère du donneur d'odeur (donc hétérospécifique par rapport à l'individu teste) a été suffisante pour engendrer une discrimination olfactive par le mâle *Mus spicilegus* (Maslak and Gouat, 2002). Ces résultats confirment l'hypothèse selon laquelle la discrimination olfactive individuelle n'est pas limitée à un seul signal chimique spécifique à l'espèce, mais est présente entre espèces différentes.

La reconnaissance des individus apparentés permet encore de limiter les interactions, soit à la famille à laquelle l'individu appartient, soit aux individus en dehors de la famille, selon le type d'interaction envisagée. Une étude a montré qu'un individu va passer plus de temps à examiner l'odeur d'un autre individu si celui-ci est plus proche de lui génétiquement. Ce processus est toujours présent même si l'animal a été élevé avec des individus d'une autre espèce, ce qui montre bien que c'est sa propre odeur qui lui sert de référence (Heth et al, 2003). Un individu peut donc évaluer son degré de parenté avec un autre individu en comparant sa propre odeur corporelle à celle de l'individu.

Une expérience similaire de placement dans une famille d'accueil, est décrite par Johnston : de jeunes femelles hamster ont été placées en famille d'accueil. Une fois la maturité sexuelle atteinte, ces femelles explorent plus rapidement et durant une plus longue période les odeurs provenant de mâles non apparentés et non familiers, comparé aux odeurs de leurs propres frères, eux aussi non-familiers (Johnston, 2003). Cette expérience fait pencher la balance pour l'hypothèse de la référence à sa propre odeur puisqu'à l'âge où les femelles ont été changées de nid, elles n'ont pas pu mémoriser l'odeur produite par les glandes des flancs de leurs frères, qui ne se développent qu'à partir de la maturité sexuelle. De plus, les jeunes femelles sont séparées trop tôt de leur famille d'origine par rapport au développement de leur système olfactif pour bien percevoir l'odeur des flancs de leur mère.

Ainsi, les individus venant d'une même famille, et donc très proches génétiquement, possèdent des odeurs extrêmement similaires. On peut donc dire qu'il existe une signature olfactive familiale. Elle permettrait d'éviter les croisements consanguins : ainsi, s'il arrive à un individu de rencontrer un membre de sa famille, que ce soit dans son environnement immédiat ou même s'ils ne vivent pas habituellement ensemble, il reconnaîtra leur proximité génétique et ne sera pas tenté de s'accoupler (Mateo, 2003).

La signature olfactive individuelle, ou odortype, participe à la reconnaissance de l'individu, surtout chez les rongeurs chez lesquels l'olfaction est un sens plus développé que la vue. Cette reconnaissance individuelle est importante pour la régulation de certains comportements : elle joue entre autres un rôle dans le choix et la reconnaissance du partenaire, le succès de la reproduction ou encore les relations mère/jeunes.

La reconnaissance individuelle nécessite d'identifier un grand nombre d'animaux de manière unique, elle fait donc appel à des mécanismes complexes et requiert une perception spécifique et des capacités discriminatoires évoluées (Mateo, 2004)

Cette capacité de différencier les individus spécifiques apporte des bénéfices considérables, l'animal peut ainsi mémoriser et utiliser les informations issues de rencontres préalables pour adapter les futures réponses en cas de nouvelle rencontre. Par exemple, cela pourrait permettre d'éviter les rencontres avec un individu contre lequel l'animal a déjà perdu un affrontement, ou de reconnaître un partenaire sexuel durable.

L'olfaction joue un rôle primordial dans les relations qu'entretiennent les animaux avec leur environnement social et physique, elle 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).

Chez plusieurs espèces de rongeurs le comportement maternel est complexe car plusieurs mères partagent un nid commun, regroupant leurs ressources et facilitant la défense (élevage

alloparental) : les mères reconnaissent l'ensemble des petits du nid comme les leurs. L'olfaction est essentielle au comportement maternel (Levy et al, 2004).

Deux mécanismes de reconnaissance de la progéniture basés sur une reconnaissance individuelle sont proposés chez les rongeurs (Mateo, 2003) : la « prior association » consiste à identifier l'ensemble des petits au sein d'un nid de manière individuelle, le « self-referent phenotype matching » consiste pour chaque individu à reconnaître les individus apparentés dans le nid.

Une expérience a mis en évidence la présence d'odeurs issues du CMH (complexe majeur d'histocompatibilité) chez des souriceaux âgés d'un jour (Yamazaki et al., 1992), ce qui montre bien que la mère peut détecter le CMH de ses petits dès le début. Une autre étude a montré que les souris allaitantes ramenaient préférentiellement au nid les jeunes ayant un CMH proche du leur (Yamazaki et al., 2000).

Nos résultats mettent en évidence une diminution du taux de leucocytes dans le sang, qui perdure jusqu'au 21^{ème} jour postnatal. 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). L'obturation nasale précoce est associée à la mise en place d'une réponse adrénalinienne au stress et à une réduction des niveaux plasmatiques en hormones thyroïdiennes. L'hypercorticotéronémie est connue pour avoir des effets délétères sur les organes lymphoïdes et des impacts immuno-modulateurs sur la réponse immunitaire spécifique. 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).

La privation olfactive entraîne également une atrophie du cerveau, cette atrophie spécifique subsiste jusqu'au 21^{ème} jour postnatal aussi bien chez les mâles que chez les femelles.

En effet, nos résultats montrent qu'une obturation nasale réalisée du 8^{ème} au 15^{ème} jour postnatal a des conséquences qui perdurent au moins jusqu'à 21 jours. L'obturation 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'hypercorticostéronémie postnatals 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).

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

En conclusion, l'obturation 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'obturation 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.

L'obturation 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'obturation 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'obturation 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 cette thèse montre que l'obturation nasale précoce perturbe l'équilibre de l'individu. 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.

L'obturation 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 obturation nasale précoce.

De nombreuses études comportementales peuvent également être envisagées. Ainsi, les mères des portées exposées à l'obturation nasale perçoivent la détresse de leur progéniture mais la nature des signaux mis en jeu reste à déterminer.

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'obturation des narines. Par exemple, le dosage des hormones hypothalamiques (CRH et TRH) et hypophysaires (TSH) permettrait en outre de préciser les mécanismes sous-jacents aux variations de concentrations en corticostérone et en hormones thyroïdiennes.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. **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.
2. **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.
3. **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.
4. **Blass, E.M., Teicher, M.H., 1980.** Suckling. *Science* 210, 15-22. Brennan et Keverne, 1997
5. **Brown, R.E., 1982.** Preferences of pre- and post-weanling Long-Evans rats for nest odors. *Physiol. Behav.* 29, 865-874.
6. **Brunjes, P.C., Alberts, J.R., 1979.** Olfactory stimulation induces filial preferences for huddling in rat pups. *J. Comp. Physiol. Psychol.* 93, 548-555.
7. **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.
8. **Chrousos, G.P., 1995.** The Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis and Immune-Mediated Inflammation. *N. Engl. J. Med.* 332:1351-1362.
9. **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.
10. **Cornwell-Jones, C., Sobrian, S.K., 1977.** Development of odor-guided behavior in Wistar and Sprague-Dawley rat pups. *Physiol. Behav.* 19, 685-688.

11. 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.
12. 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.
13. Dauge, V., Steimes P., Derrien M., Beau N., Roques B.P., Feger J., 1989. CCK8 effects on motivational and emotional states in rats involve CCKA receptors of the postero-medial part of the nucleus accumbens. *Pharmacol Biochem Behav* 34: 157–163.
14. 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.
15. 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.
16. Doty R.L., 1986. Odor-guided behavior in mammals. *Experientia* 42:257–271.
17. Duchamp-Viret ; P., Chaput M.A., Duchamp A., 1999. Odor response properties of rat olfactory receptor neurons. *Science* 284:2171–2174.
18. Duchamp-Viret, P., 2012. Entretien personnel avec Patricia Duchamp-Viret, travaillant sur l'olfaction au Centre de Recherches en Neurosciences de Lyon.
19. Erkan, M., Erhan, E., Saglam, A., Arslan, S., 1994. Compensatory mechanisms in rats with nasal obstructions. *Tokai J. Exp. Clin. Med.* 19, 67-71.
20. Fabris, N., Mocchegiani, E., Provinciali, M., 1995. Pituitary-thyroid axis and immune system: a reciprocal neuroendocrine-immune interaction. *Horm. Res.* 43, 29-38.
21. 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.

- 22. Friedrich, R.W., and Laurent, G., 2001.** Dynamic optimization of odor representations by slow temporal patterning of mitral cell activity. *Science* 291, 889–894.
- 23. 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.
- 24. Galef, B.G., Jr., & Wigmore, S. W., 1983.** Transfer of information concerning distant foods: A laboratory investigation of the “informationcentre” hypothesis. *Animal Behaviour*, 31, 748-758.
- 25. Gomez, G., Atema, J., 1996.** Temporal resolution in olfaction: stimulus integration time of lobster chemoreceptor cells. *J. Exp. Biol.* 199, 1771-1779.
- 26. Gouat, P., Patris, B., & Lalande, C. 1998.** Conspecific and heterospecific behavioural discrimination of individual odours by mound-building mice. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences Paris*, 321, 571–575.
- 27. Gray, C.M., König, P., Engel, A.K., and Singer, 1989.** W. Oscillatory responses in cat visual cortex exhibit inter-columnar synchronization which reflects global stimulus properties. *Nature*. 1989; 338: 334-337.
- 28. 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.
- Hall en1934
- 29. 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.

- 30. 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.
- 31. Hepper, P., 1983.** Sibling recognition in the rat. *Anim. Behav.*, 31,1177-91.
- 32. Heth, G., Todrank, J., Busquet, N., Baudoin, C., 2003.** Genetic relatedness assessment through individual odour similarities (G-ratios) in mice. *Biol. J. Linnean Soc.* **78**,595–603.
- 33. 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.
- 34. 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.
- 35. 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.
- 36. Johnson, B.N., Mainland, J.D. and Sobel, N., 2003.** Rapid olfactory processing implicates subcortical control of an olfactomotor system. *J. Neurophysiol.* 90, 1084–1094.
- 37. Kalogjera, L., Pegan, B., Petric, V., 1991.** Compensatory mechanisms induced by high oropharyngeal airway resistance in rats. *Acta Otolaryngol.* 111, 384-388.
- 38. Keller, M., Bakker, J., 2009.** Pheromonal communication in higher vertebrates and its implication on reproductive function. Editorial. *Behav. Brain Res.* 200, 237–238.
- 39. Keverne, E.B., 1995.** Olfactory learning. *Curr. Opin Neurobiol.*5, 482-488.
- 40. Kimmelman, C.P., 1993.** Clinical review of olfaction. *Am. J. Otolaryngol.* 14, 227- 239.

- 41. Koibuchi, N., Chin, W.W., 2000.** Thyroid hormone action and brain development. *Trends Endocrinol. Metab.* 11, 123-128.
- 42. Koibuchi, N., Iwasaki, T., 2006.** Regulation of brain development by thyroid hormone and its modulation by environmental chemicals. *Endocr. J.* 53, 295-303.
- 43. 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.
- 44. Laing, D.G., 1983.** Natural sniffing gives optimum odour perception for humans. *Perception*, 12, 99–117.
- 45. 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.
- 46. Lazarus, R. S., Folkman, S., 1984.** Stress, appraisal, and coping. *New York: Springer Publishing Company, Inc.*
- 47. Lee, M.H., Williams, D.I., 1977.** Longitudinal study of mother - young interaction in the rat : the effect of infant stimulation, diurnal rhythms and pup maturation. *Behaviour* 63, 241-261.
- 48. Leon, M., Moltz, H., 1971.** Maternal pheromone: discrimination by pre-weanling albino rats. *Physiol. Behav.* 7, 265-267.
- 49. Leone, R.J. Jr, Krasna, I.H., 2000.** 'Spontaneous' neonatal gastric perforation: is it really spontaneous? *J. Pediatr. Surg.* 35, 1066-1069.
- 50. Lévy, F., Keller, M., and Poindron, P., 2004.** Olfactory regulation of maternal behavior in mammals. *Hormones and Behavior* 46, 284–302.
- 51. Levy, F., Poindron, P., and Le Neindre, P., 1983.** Attraction and repulsion by amniotic fluids and their olfactory control in the ewe around parturition. *Physiology & Behavior* 31, 687– 692.

- 52. Ma, W., Miao, Z., and Novotny, M.V., 1999.** Induction of Estrus in Grouped Female Mice (*Mus domesticus*) by Synthetic Analogues of Preputial Gland Constituents. *Chem. Senses* 24, 289–293.
- 53. Maslak, S., and Gouat, P., 2002.** Short-term contact elicits heterospecific behavior discrimination of individual odors in mound-building mice (*Mus spicilegus*). *Journal of Comparative Psychology* 116, 357–362.
- 54. Mateo, J.M., 2003.** Kin recognition in ground squirrels and other rodents. *Journal of Mammalogy* 84, 1163–1181.
- 55. Mateo, J.M., 2004.** Recognition systems and biological organization: The perception component of social recognition. *Annales zoologici Fennici* 41, 729–745.
- 56. 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.
- 57. 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.
- 58. Moss, M.L., 1969.** The primary role of functional matrices in facial growth. *Am. J. Orthod.* 55, 566-577.
- 59. Mouly, A.M., Kindermann, U., Gervais, R., Holley, A., 1993.** Involvement of the olfactory bulb in consolidation processes associated with long-term memory in rats. *Behav Neurosci.* 107: 451-457.
- 60. 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.
- 61. 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.

62. Nakajima, K., Ohi, G., 1977. Aerophagia induced by the nasal obstruction on experimental animals. *Jikken Dobutsu*. 26, 149-159.
63. 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.
64. Nyberg, L., 2005. Any novelty in hippocampal formation and memory? *Curr. Opin. Neurol.* 18, 424-428.
65. Oberkotter, L.V., 1988. Suckling, but not formula feeding, induces a transient hyperthyroxinemia in rat pups. *Endocrinology* 123, 127-133.
66. Oppenheimer, J.H., Schwartz, H.L., 1997. Molecular basis of thyroid hormonedependent brain development. *Endocr. Rev.* 18, 462-475.
67. Ottaviani, E., Franceschi, C., 1996. The neuroimmunology of stress from invertebrates to man. *Prog. Neurobiol.* 48, 421-440.
68. Pacak, K., Palkovits, M., 2001. Stressor specificity of central neuroendocrine responses: implications for stress-related disorders. *Endocr. Rev.* 22, 502-548.
69. Polan, H.J., Hofer, M.A., 1998. Olfactory preference for mother over home nest shavings by newborn rats. *Dev. Psychobiol.* 33, 5-20.
70. 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.
71. 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.
72. Rajan, R., Clement, J.P., Bhalla, U.S., 2006. Rats smell in stereo. *Science* 311, 666-670.

- 73. 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.
- 74. Ravel, N., Elaagouby, A., Gervais, R., 1994.** Scopolamine injection into the olfactory bulb impairs short-term olfactory memory in rats. *Behav Neurosci.* 108: 317-324.
- 75. Risser, J.M., Slotnick, B.M., 1987.** Nipple attachment and survival in neonatal olfactory bulbectomized rats. *Physiol. Behav.* 40, 545-549.
- 76. Selye, H., 1950.** Stress and the general adaptation syndrome. *Br. Med. J.* 1, 1383- 1392.
- 77. Schaal, B., and Orgeur, P., 1992.** Olfaction in utero: Can the rodent model be generalized? *The Quarterly Journal of Experimental Psychology Section B* 44, 245–278.
- 78. 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.
- 79. 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.
- Shaker *et al.*, 1973;
- 80. Shepherd, G.M., 2004.** The Human Sense of Smell: Are We Better Than We Think? *PLoS Biol* 2, e146.
- 81. Shepherd, G.M., 2005.** Perception without a Thalamus: How Does Olfaction Do It? *Neuron* 46, 166–168.
- 82. Shepherd, G.M., Chen, W.R., and Greer, C.A. 2004.** Olfactory Bulb. In *The Synaptic Organization of the Brain*, (Oxford University Press), pp. 165–216.

- 83. 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.
- 84. Singh, P.J., Tobach, E., 1975.** Olfactory bulbectomy and nursing behavior in rat pups (Wistar DAB). *Dev. Psychobiol.* 8, 151-164.
- 85. 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.
- 86. Sobel, N., Thomason, M.E., Stappen, I., Tanner, C.M., Tetrud, J.W., Bower, J.M., Sullivan, E.V. and Gabrieli, J.D., 2001.** An impairment in sniffing contributes to the olfactory impairment in Parkinson's disease. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 98, 4154–4159.
- 87. Song, C., Leonard, B.E., 2005.** The olfactory bulbectomised rat as a model of depression. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 29, 627-647.
- 88. Stefanski, V., Engler, H., 1999.** Social stress, dominance and blood cellular immunity. *J. Neuroimmunol.* 94, 144-152.
- 89. 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.
- 90. 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.
- 91. 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.
- 92. Vig, K.W., 1998.** Nasal obstruction and facial growth: the strength of evidence for clinical assumptions. *Am. J. Orthod. Dentofacial Orthop.* 113, 603-611.

- 93. 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.
- 94. 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.*
- 95. Yamazaki, K., Beauchamp, G.K., Curran, M., Bard, J., and Boyse, E.A., 2000.** Parent–progeny recognition as a function of MHC odortype identity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97, 10500 –10502.
- 96. Yamazaki, K., Beauchamp, G.K., Imai, Y., Bard, J., and Boyse, E.A., 1992.** Expression of urinary H-2 odortypes by infant mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 2756–2758.

ANNEXES: (Productions scientifiques)

Annexe 1 :

Tunisian Journal of Medicinal Plants and Natural Products (TJMPNP) www.TJMPNP.com

Dorbani A. et al. / Tunis. J. Med. Plants Nat. Prod. 2014; 12: 1-8.

**STRESS DE SEPARATION ET PERTURBATIONS OLFACTIVES ET
COMPORTEMENTALES CHEZ LE RAT WISTAR**

DORBANI A.^a ; OUAKID M.L.^{a*} ; BAIRI A.^a ; TAHRAOUI A.^a.

^a *Laboratoire de Neuro-Endocrinologie Appliquée Département de Biologie, Faculté des Sciences, BP 12 Université Badji Mokhtar - 23000 Annaba, Algérie.*

Received 23 January 2014; received in revised form September 2014; Accepted 01 October 2014

Abstract

Numerous animal models of early stress are currently being developed because early stress results in long-term disruptions of neuronal functions and the development of longterm behavioral disorders. The fundamental importance of the bond between the mother and the offsprings, in all mammalian species, for the development of the newborn, point to the great interest of animal models of mother/pups separation.

In our study we try to describe the neurobiological and behavioral consequences of this early stress on the development of young rats. Behavioral studies have shown that olfactif and palatability behavior are disrupted, possibly due to the effects of early stress on neurodevelopment. We also appreciated some disorders of the immune system through the rates of lymphocytes, Haemoglobin and monocytes. The stress of maternal separation installs a fairly convincingly anxiety and a depression that interfere with their laps with

all of cognitive and immune function.

Keywords: Stress of separation, anxiety, olfaction, Open- Field, Plus Maze, Wistar.

Résumé : Chez l'homme, comme chez l'animal, les liens qui unissent la mère à son nouveau-né revêtent une importance fondamentale dans le développement harmonieux de la progéniture. L'exposition à la séparation de la mère en début de vie, peut être associée à un risque de développement des troubles comportementaux à l'âge adulte.

Cette séparation constitue un stress précoce qui, parce qu'il survient pendant une période de développement neuronal intense, est susceptible d'engendrer un fonctionnement cérébral anormal de façon durable. Ces modèles sont donc étudiés pour tenter de décrire les conséquences neurobiologiques et comportementales néfastes de ce stress précoce sur le développement des petits.

Au terme de ce travail portant sur les effets du stress nous pouvons avancer un certain nombre de pistes qui restent à explorer sur les capacités adaptatives et comportementales chez le rat. Le stress de séparation installe d'une manière assez convaincante une anxiété et une dépression qui à leurs tours interfèrent avec l'ensemble des fonctions cognitives et immunitaires.

Mots clés : Stress de séparation, anxiété, olfaction, Open- Field, Plus Maze, Wistar.

1. Introduction :

Tout comme les humains, les rongeurs ont aussi des moments de stress, dans la journée, notamment si leur rythme de vie se montre perturbé, ce qui peut entraîner de graves

conséquences physiques et psychologiques chez eux. En leur changeant leurs habitudes, en leur perturbant leur environnement.

Les études neurobiologiques ont permis de préciser la nature et le rôle des systèmes hormonaux et neuronaux qui sont impliqués dans la mise en œuvre et régulation du stress. Tandis que les travaux psychologiques se sont intéressés aux aspects relationnels entre la réaction et l'agression. Ainsi, le concept du stress s'est élargi aux agressions psychologiques et sociales. [1]

Le stress est un ensemble de réponses non spécifiques de l'organisme pour faire face à des situations d'agression. L'ensemble de ces réponses est appelé syndrome général d'adaptation (SGA). Correspond à l'aspect physiologique, humoral et endocrinien de la réaction de ce complexe d'agression-réaction. Le syndrome général d'adaptation. Qui évolue en 3 phases dans le temps : la phase d'alarme ou d'alerte, la phase de résistance ou d'adaptation et la phase d'épuisement. Selon cette définition le stress est un état qui se manifeste par un syndrome spécifique, englobant tous les changements spécifiques qui interviennent dans le système biologique. [2]

La réaction du stress n'est donc plus considérée comme une simple réponse limitée dans le temps mais devient une réponse adaptative, dynamique et qui est à la fois biologique et comportementale par la mise en jeu de l'axe hypothalamo-hypophyso-corticosurrénalien appelé axe corticotrope. [3]

Chez les mammifères, les liens entre la mère et le nouveau-né sont d'une importance fondamentale dans le développement harmonieux de la progéniture. Cela rend les modèles murins de séparation mère/nouveau-né d'un grand intérêt dans le cadre des hypothèses neuro-développementales des affections psychiatriques. Le stress de séparation considéré comme un stress cognitif, a depuis déjà des années bénéficié des études sur différents paliers. Cela a été

possible par l'introduction de nouvelles approches essentiellement neurobiologique et comportementales [4].

2. Matériels et méthodes :

2.1. Matériels biologiques :

2.1.1. Animaux :

Les animaux utilisés dans le cadre de cette étude sont des rats mâles adultes *Rattus rattus* de la souche Wistar, classe des mammifères nocturnes de l'ordre des rongeurs provenant d'institut Pasteur d'Alger. La gestation dure 20 -23 jours et les portées sont de 8 - 14 jeunes. Ceux-ci pèsent 5-7g.

2.1.2. Conditions d'élevage :

Les rats répartis en lots sont maintenus dans les conditions de température 25°C, une hygrométrie de 50% et de la photopériode naturelle. La nourriture se présente sous forme de « bouchons » ou pellettes constituées essentiellement de soja et de maïs. L'eau leurs est fournie dans des biberons adaptés aux cages. Les rats ont un accès libre à l'eau et à l'aliment (ad libitum). Après une période d'adaptation ; Ces animaux ont été répartis en quatre (04) lots expérimentaux (lot T, lot 5, lot 30, lot 1h).

2.2. Méthodes :

2.2.1. Protocole de séparation :

Ce type de protocole expérimental a essentiellement été utilisé chez le rat et la souris. Quatre femelles gestantes ont été élevées individuellement. Le jour de la naissance des petits a été nommé J0. Le protocole de séparation maternelle a commencé dès J3. A J3, on a effectué des lots de 5 à 12 ratons, et répartis en quatre groupes expérimentaux :

Le lot T : aucun traitement (n=5).

Le lot 30 : séparation de 30 (n=11)

Le lot 5 : séparation de 5 mn (n=12)

Le lot 1 : séparation d'une heure (n=8)

a. Evaluation de la reconnaissance olfactive :

Ce test nous permet d'apprécier la reconnaissance olfactive de l'environnement direct des animaux. A cet effet nous avons constitué deux types de sciure : l'une propre(SP) et l'autre ayant été utilisée dans un nid (SN).

Sciure nid x sciure propre : les jeunes sont soumis à l'odeur provenant d'une enceinte expérimentale dont le sol est recouvert de sciure propre. L'autre enceinte contient de sciure imprégnée d'urine et de fèces maternels prélevée dans la cage d'élevage 5 min avant le début du test.

Les enceintes expérimentales sont placées de façon aléatoire d'un côté ou de l'autre du labyrinthe. Le labyrinthe est brièvement nettoyé à l'alcool à 70° puis laissé à sécher durant le passage de deux individus (8 min environ).

Les différents paramètres sont pris en compte :

- Le temps de latence, temps nécessaire avant d'effectuer le 1er choix.
- Le temps passé dans chaque type de sciures.

b. Evaluation du comportement d'appétence dans le test de la consommation d'eau sucrée :

Le processus de test de la consommation d'eau sucrée est le suivant :

Les animaux étaient placés dans des cages individuelles, avec deux biberons standards, contenant soit de l'eau pour les lots d'animaux (témoins, 5min ,30min ,1h), soit une solution d'eau sucrée (à la concentration de 40mg de sucre/ L d'eau) leur était mis à disposition pour une durée de 15jours. On mesure la quantité d'eau dans les biberons avant et après la consommation, afin d'évaluer les quantités respectives consommées [5] [6].

3. Résultats :

3.1. Reconnaissance Olfactive :

Le temps de latence des rats séparés 1h est remarquablement faible par rapport au lot témoin (12.566 ± 2.908 vs 28.543 ± 08.60).

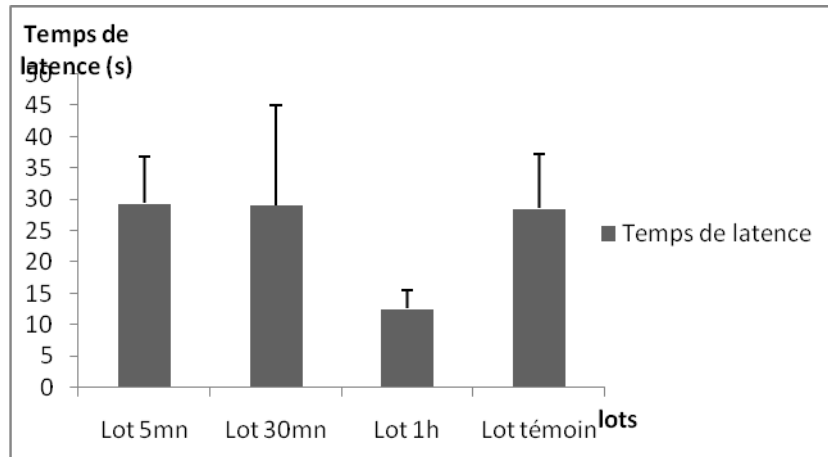


Figure 1 : temps de latence (s) et comportement olfactif de lot témoin et traités, (lot 5mn n=5, lot 30mn n=12, lot1h n=11, lot tm n=8).

On enregistre un temps d'exploration des compartiments à sciure nid et sciure propre, variable entre les quatre lots. Pour le temps passé dans le compartiment à sciure propre : Lot5mn (37.99 ± 1.032), lot 30mn (46.231 ± 15.182) et lot 1h (7.92 ± 1.979) vs lot témoin (31.3 ± 9.236), quant au compartiment à sciure nid, on note aussi une différence significative chez le lot des rats séparés 5mn (66.87 ± 15.695), lot 30mn (133.633 ± 24.323), lot 1h (18.855 ± 5.989) vs lot témoin (26.583 ± 10.236).

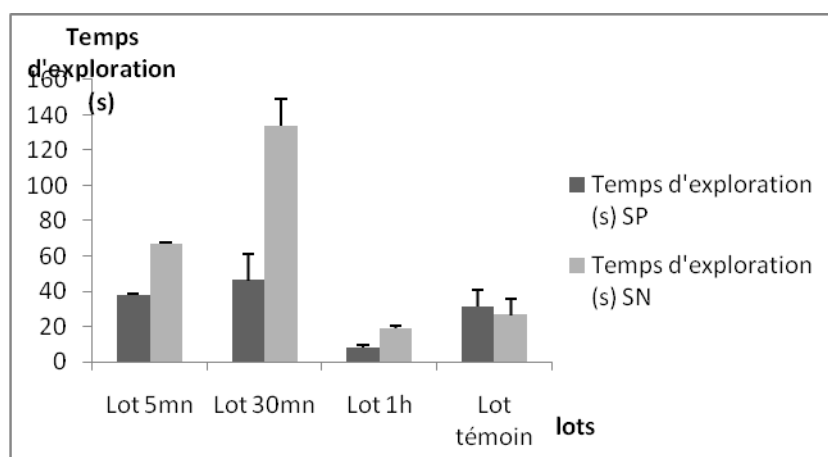


Figure 2 : temps d'exploration(s) et comportement olfactif de lot témoin et traités (lot5mn n =5, lot 30mn n=12, lot1h n=11, lot tm n=8).

P : Seuil de signification.

* : différence significative témoin *vs* séparé ($p \leq 0.05$).

SP : sciure propre. SN : sciure nid.

3.2. Comportement d'appétence :

On a évalué l'effet de la séparation maternelle sur la consommation d'eau sucrée. On observe une différence hautement significative des quantités d'eau sucrée et d'eau ordinaire, consommées chez les lots expérimentaux.

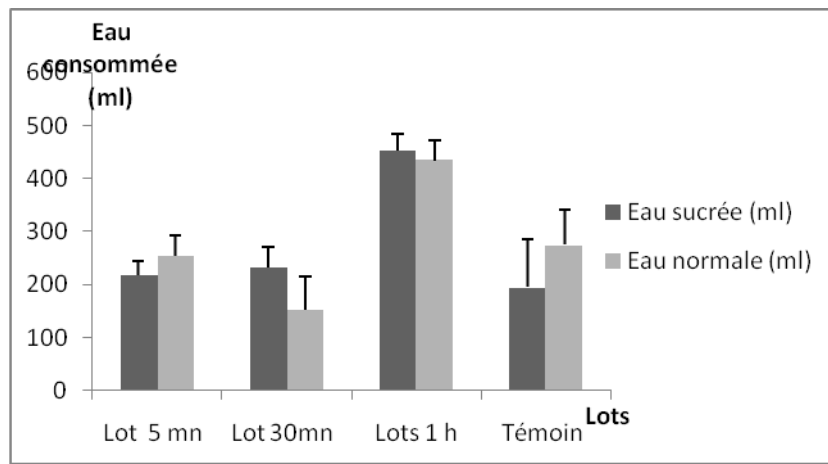


Figure 3 : Quantités d'eau sucrée consommées suite au stress de séparation dans le test de l'eau sucrée (ml) (lot 5mn n=5, lot 30mn n=12, lot 1h n=11, lot tm n=8).

P : Seuil de signification.

S : eau sucré.

*** : différence très hautement significative témoin

N : eau saumâtre (normal).

vs séparé ($p \leq 0.001$).

3.3. Formule lymphocytaire :

On a comparé tous les paramètres dosés des lots traités et témoins à travers le taux de l'hémoglobine, lymphocytes et monocytes. On enregistre statistiquement une différence significative du taux des hémoglobines pour les lots séparés lot 5mn (14.15 ± 0.842), lot 30mn (13.75 ± 0.928), lot 1h (11.225 ± 1.77) *vs* lot témoin (4.325 ± 5.713).

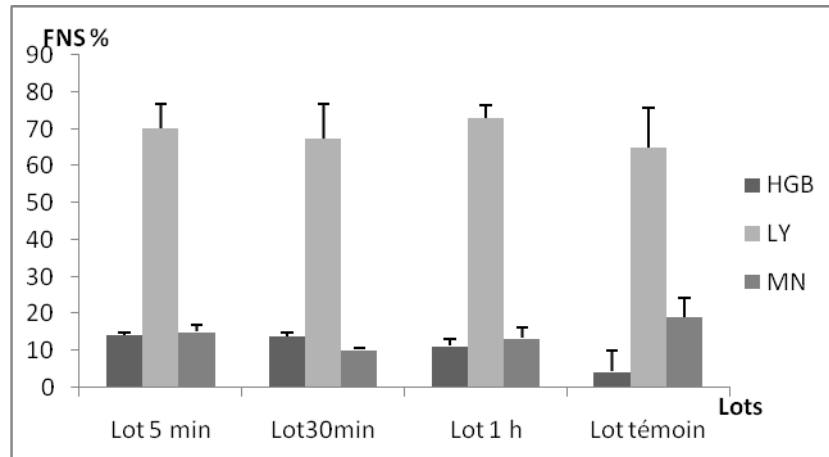


Figure 4 : variations des taux de lymphocytes et de monocytes des lots témoins et traités

P : Seuil de signification.

* : différence significative
témoin vs séparé ($p \leq 0.05$).

ns : différence non significative
témoin vs séparé ($p \leq 0.05$).

HGB : hémoglobine.

LY : lymphocyte.

MN : monocyte.

4. Discussion :

Chez les mammifères, les liens entre la mère et le nouveau-né sont d'une importance fondamentale dans le développement harmonieux de la progéniture. Cela rend les modèles murins de séparation mère/nouveau-né d'un grand intérêt dans le cadre des hypothèses neuro-développementales des affections psychiatriques. Des séparations longues tendent à installer, chez le raton devenu adulte, des troubles anxieux, « dépressifs », et une conduite de dépendance aux drogues.

Plus récemment, une variante du modèle de séparation 3 h a été développée. Le nouveau-né est non seulement séparé de sa mère, mais également de ses congénères pendant 3 h par jour du 1er au 14e jour. Une priorité a été donnée à l'étude des systèmes neuropeptidergiques, en particulier de type enképhalinergique et cholécystokininergique (CCKergique). Des données de la littérature montrent que le système opioïdique est, chez le rongeur comme chez le singe, très impliqué dans la mise en place des relations entre la mère et le petit [7] [8]. Les opioïdes entraînent ainsi des effets renforçateurs positifs (ils favorisent un comportement d'approche ou de consommation) dès le plus jeune âge: l'allaitement induit une libération d'opioïdes chez le nouveau-né, ce qui lui permettrait de considérer la tétée comme ayant des propriétés de récompense et favoriserait les associations entre la mère, la tétée et l'état de récompense [9]. [10]. L'eau sucrée étant appétissante pour les rongeurs, la mesure de sa consommation permet d'évaluer l'état hédonique/anhédonique des animaux. La consommation d'eau sucrée des rats séparés est augmentée, particulièrement lorsque les rats ont subi un stress supplémentaire d'isolement. Enfin, une plus grande sensibilité aux effets renforçateurs de la morphine est notée dans un test de préférence de place (un conditionnement de place est favorisé par la morphine) Les rats nouveau-nés séparés présentent donc, à l'âge adulte, une hypersensibilité aux effets de récompense (eau sucrée) et aux effets renforçateurs de la morphine, alors que leur réponse nociceptive n'est pas altérée):

ces données suggèrent l'existence d'un dysfonctionnement cérébral partiel du système opioïdérique. 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 [11], du nid [12], des partenaires apparentés ou familiaux [13]. 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. [14]. [15]. La littérature rapporte de façon constante une réponse adrénalinienne 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 [16]. [17]. Cette hypothèse est notamment soutenue par l'étude de Gaskin et Kitay en 1970 [18] 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 [19]. En effet, les mères passent plus de temps à lécher la région ano-génitale des jeunes mâles [20] 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 [21] [22]. Les résultats obtenus manifestent que le léchage et le toilettage maternels favorisent la croissance et le développement. Des études passées ont signalé que la progéniture ayant profité d'un haut niveau de léchage et de toilettage montre un développement cognitif supérieur quant à l'apprentissage spatial et à la reconnaissance. 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 [23] [24]. [25].

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 [26] [27].

Ainsi, contrairement à l'adulte, le rat juvénile ne présente pas de comportement d'alternance spontanée [28], test expérimental utilisé pour étudier le comportement exploratoire et la mémoire spatiale.

Comparativement à ces résultats, l'absence de différence significative 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. Alors que le taux de retour au nid et le temps passé du côté du nid restent significativement différents. Ainsi cet aspect révélé par le test sciure propre vs sciure nid met en évidence une perturbation de la mémoire procédurale avec une capacité d'adaptation déjà perceptible dans le temps où les rats séparés reprennent la tendance du témoin.

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 3ème jour postnatal [29] ; le jeune présente alors des préférences olfactives pour son propre nid par rapport à un nid étranger. Les jeunes rats préfèrent toutefois s'orienter vers l'odeur de leur mère que vers l'odeur de leur nid [30]. Les signaux olfactifs induisent également des préférences filiales pour le regroupement des ratons au sein du nid [31].

Les variations immunitaires appréciables à travers le taux de lymphocytes indiquent clairement un ensemble de pistes qui intègrent la place du système immunitaire dans la boucle de contrôle de l'homéostasie.

5. Conclusion :

Des études sur l'impact d'un stress précoce sur le développement cérébral devraient permettre de mieux comprendre l'incidence de ce type de stress sur le comportement mental pathologique, sans négliger l'importance des facteurs déclenchants, susceptibles de faire basculer l'individu de la vulnérabilité à la pathologie.

Le stress de séparation installe d'une manière assez convaincante une anxiété et une dépression qui à leurs tours interfèrent avec l'ensemble des fonctions cognitives et immunitaires.

Une probable fragilité de l'animal à travers la modification de la sphère olfactive est à mettre en évidence ainsi que la perte du plaisir (anhédonisme).

Une perturbation du lien maternel entraîne chez le rat un dysfonctionnement cérébral durable et des troubles comportementaux ou anxieux.

6. Références bibliographiques :

- 1) **Ma, S., Morilak, D.A., 2004.** Induction of FOS expression by acute immobilization stress is reduced in locus coeruleus and medial amygdala of Wistar-Kyoto rats compared to Sprague-Dawley rats. *Neuroscience*;124(4):963-72.
- 2) **Selye, H., 1936.** A syndrome produced by diverse nocuous agents. *Nature* 138(3479, July4):32.
- 3) **Kalinichev, M., Easterling, K.W., Plotsky, P.M., Holtzman, S.G., 2002.** Long-lasting changes in stress-induced corticosterone response and anxiety-like behaviors as a consequence of neonatal maternal separation in Long-Evans rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* , 73, 131-140.

- 4) **Boudarene, M., Timsit-Berhtier, M., Legros, J.J., 1997.** Qu'est ce que le stress ? *Revue Medicale de Liege*.52 (1):1-6.
- 5) **Willner, P., Towell, A., Sampson, D., Muscat, R., Sophokleous, S., 1987.** Reduction of sucrose preference by chronic mild stress and its restoration by a tricyclic antidepressant. *Psychopharmacology*, **93**, 358-364.
- 6) **Lamouraux, S., Texier, N., Canestrelli, C., Beslot, F., Dauge, V.** Dysfunctioning of opioidergic and cholecystokinergic systems after maternal separation in adult rats. *Psychopharmacology*, soumis.
- 7) **Carden, S., Hofer, M., 1990.** Socially mediated reduction of isolation distress in rat pups is blocked by naltrexone but not by RO15-1788. *Behav Neurosci*. 104: 457-64.21.
- 8) **Harris, J.C., Newman, J.D., 1988.** Combined opiate/adrenergic receptor blockade enhances squirrel monkey vocalization. *Pharmacol Biochem Behav*. 31: 223-6.
- 9) **Agmo, A., Barreau, S., Lemaire, V., 1997.** Social motivation in recently weaned rats is modified by opiates. *Dev Neurosci* 19: 505-20.
- 10) **Uvnas-Moberg, K., 1989.** Gastrointestinal hormones in mother and infant. *Acta Paediatr Scand* 351: 88-93.
- 11) **Blass, E.M., Teicher, M.H., 1980.** Suckling. *Science* 210, 15-22.
- 12) **Brown, R.E., 1982.** Preferences of pre- and post-weanling Long-Evans rats for nest odors. *Physiol. Behav*. 29, 865-874.
- 13) **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.
- 14) **Seiden, A.M., Duncan, H.J., 2001.** The diagnosis of a conductive olfactory loss. *Laryngoscope* 111, 9-14.

- 15) **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.
- 16) **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.
- 17) **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.
- 18) **Gaskin, J.H., Kitay, J.I., 1970.** Adrenocortical function in the hamster. Sex differences and effects of gonadal hormones. *Endocrinology* 87, 779-786.
- 19) **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.
- 20) **Moore, C.L., Morelli, G.A., 1979.** Mother rats interact differently with male and female offspring. *J Comp Physiol Psychol*; 93:677-84.
- 21) **Vazquez, D.M., 1998.** Stress and the developing limbic-hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Psychoneuroendocrinology* 23, 663-700.
- 22) **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.
- 23) **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.

- 24) 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.
- 25) Nyberg, L., 2005.** Any novelty in hippocampal formation and memory? *Curr. Opin. Neurol.* 18, 424-428.
- 26) Lalonde, R., 2002.** The neurobiological basis of spontaneous alternation. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 26, 91-104
- 27) 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.
- 28) 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.
- 29) Cornwell-Jones, C., Sobrian, S.K., 1977.** Development of odor-guided behavior in Wistar and Sprague-Dawley rat pups. *Physiol. Behav.* 19, 685-688..
- 30) Polan, H.J., Hofer, M.A., 1998.** Olfactory preference for mother over home nest shavings by newborn rats. *Dev. Psychobiol.* 33, 5-20.
- 31) Brunjes, P.C., Alberts, J.R., 1979.** Olfactory stimulation induces filial preferences for huddling in rat pups. *J. Comp. Physiol. Psychol.* 93, 548-555.

Annexe 2 :

Journal of Neonatal Biology

Dorbani et al., J Neonatal Biol 2015, 4:4 <http://dx.doi.org/10.4172/2167-0897.1000199>

Developmental perturbations in rats Wistar under early nasal obstruction

Asma Dorbani; Abdelmadjid Bairi ; Mohamed Laid Ouakid and Abdelkrim Tahraoui .

Applied Neuroendocrinology Laboratory, Department of Biology, Faculty of Science, University Badji Mokhtar BP 12 23000, Annaba, Algeria.

Rec date: September 09, 2015; Acc date: September 24, 2015; Pub date: September 30, 2015.

Abstract

The aim of this study was to investigate the effects of an early olfactory deprivation on novelty-seeking behavior and growth weight during post-natal development in rats. Therefore, we performed a bilateral nasal obstruction on 8-day-old rats and we studied its effects during (9 to 15 days of age) and after obstructive procedure (15 to 21 days of age). Animals exposed to nasal obstruction presented an impaired growth in both sexes and was maintained until the reopening nostrils (15-day-old rats). NO affected suckling behavior and mother-young relationships, it had indeed a functional impact on the olfactory abilities that disturbed the orientation to the nest. These disturbances were abrogated, even reversed, with the reopening of nostrils. These data showed that early olfactory deprivation by nasal obstruction was associated with some behavioral alterations, which may have serious consequences for the health and the social status of the individuals.

Keywords: Nasal obstruction; Olfactory deprivation; Exploratory Behaviour; Stress; anxiety; Rat wistar.

Introduction:

For most animals smell is the primal sense. One they rely on to identify food, predators and mates. Indeed, for many organisms, odours are their most efficient means of communicating with others and interpreting their surroundings. Innate behaviour in response to smell is essential to these organisms' survival and most likely results from nonconscious perception of odours. For most mammalian species investigated so far, the female offspring relationship has been shown to rely on multimodal systems of cues and signals, among which olfaction plays a predominant, sometimes unique, role in the orchestration of mutually adaptive responses. The scientific coverage of mammalian taxa on this point is obviously partial with some (e.g. rats, mice, rabbits, pigs, sheep, squirrel monkeys and humans) having received considerably more attention than others. The best understood system of female offspring communication is unquestionably that of the rat in which various functional aspects of behavioural and

physiological fit are governed by olfaction. For example, newborns are guided to the nipples by amniotic/salivary cues spread by the female [1].

Newborn altricial mammals 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, warmth and protection, learning this odour is critical for the survival of the newborn [2]. In the rat neonate, olfactory cues from the mother and siblings are crucial in the establishment of early behaviours such as home orientation [3], huddling [4] and nursing [5]. A chronic olfactory deficit is therefore able to involve many consequences on the homeostasis of the young individual. There are some methods of olfactory deprivation closer to the pathological conditions met in nature, where the lack of olfaction is generally associated with a nasal obstruction [6]. 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 [7].

Here, we present and discuss the consequences of early nasal obstruction on physiological, structural and behavioural variables during and after obstructive procedure, bilateral nostril cauterization was induced an olfactory deprivation on 8-day-old rats of both sexes.

Materials and Methods

Biological material and animal care

In the present study, we used wistar rats (*Rattus rattus*). Ten mixedsex litters were born in the laboratory of the university. All animals were housed in standard cages on a constant 12-h light/12-h dark cycle with controlled temperature and humidity and were given access to food and water ad libitum.

Nasal obstruction procedure and experimental groups

At the age of 8 days, the litters were divided into three experimental groups. Untreated group (UT) was defined by the complete absence of manipulation (n=16). Sham group (SH) (n=16) and animals with nasal obstruction (NO) (n=16) were first anesthetized for a short period.

They were placed for few seconds in a glass bell containing a cotton wisp impregnated with ether. Once the litters were anesthetized, a bilateral nasal obstruction was performed on NO animals as previously described by Meisami [7] and Waguespack et al. [8]. 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 15. 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°C) for 1 h and they were then returned to the mothers.

Monitoring litters

In order to assess the rats growth after the induction of early nasal obstruction, the litters were observed daily From the 8th to the 21st day post-natal. The ponderal gain of each individual was calculated as follows: the difference between the final weight and the initial weight of the animals. It was expressed in gram (g).

Two-choice situation

This test allows us to appreciate the olfactory recognition of the direct environment of the animals on D9, D15 and D21. In order to assess the ability of individuals to recognize and orient themselves towards familiar odors, we have made two types of sawdust: one clean (CS) and the other used in a nest (NS).

The pups are subjected to the odor coming from an experimental enclosure whose soil is covered with clean sawdust. The other enclosure contains sawdust impregnated with urine and maternal feces collected from the breeding cage 5 min before the start of the test. Experimental enclosures are placed randomly on either side of the labyrinth. The labyrinth is briefly cleaned with alcohol at 70 ° and left to dry during the passage of two individuals (about 8 min).

The various parameters are taken into account:

- The latency time, time required before making the first choice.
- The time spent in each type of sawdust.

Statistical analysis

Data in the text and figure legends are means \pm standard errors for the indicated number (n) of animals. Statistical comparisons were made by analysis of variance (ANOVA) and differences were considered to be significant at $P < 0.05$.

Results

Effect of early nasal obstruction on growth weight:

As seen in figure 1 and 2, our results show that the weight growth of individuals differs significantly according to the experimental group ($F = 17.92$, $p < 0.0001$). ($P = 0.000$ vs controls, $p = 0.001$ vs controls) or in males ($p = 0.001$ vs controls; $p = 0.004$ vs controls). This difference is related to a significant difference in weight gain over the period J9 - J15 ($F = 18.97$, $p < 0.0001$). Individuals exposed to nasal filling thus showed less weight gain compared to control animals ($p < 0.0001$ in females, $p < 0.0001$ in males) and controls ($p < 0.0001$ in females; $p < 0.0001$ in males). Conversely, no significant difference was observed in the weight gain during period J15 - D21 ($F = 1.87$, $p = 0.33$).

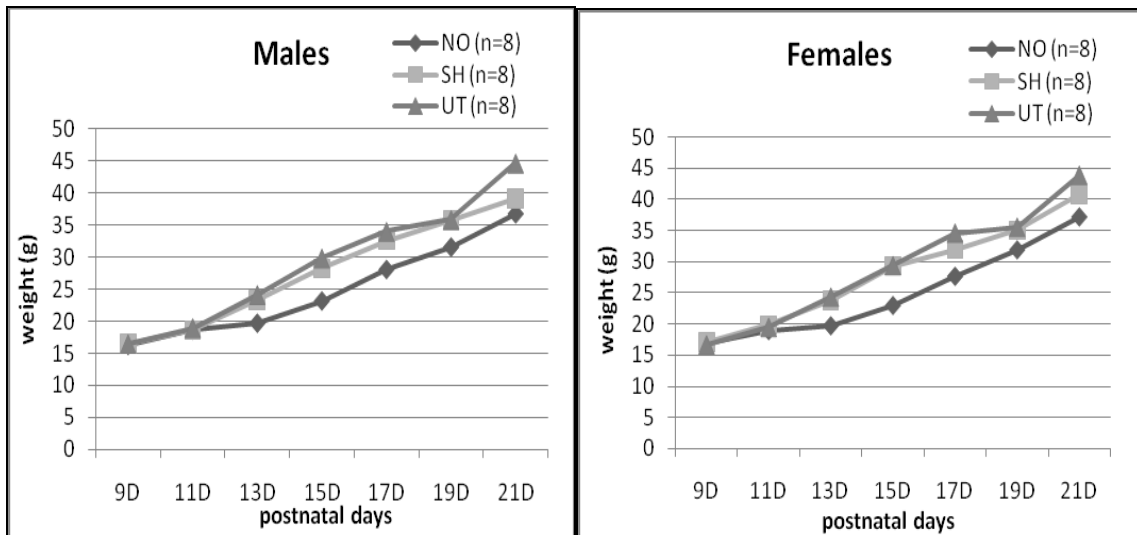


Figure 1: Growth weight (g) in animals with nasal obstruction (NO) n=8 per sex versus untreated group (UT) n=8 per sex and sham group (SH) n=8 per sex, from 9 to 21 postnatal days.

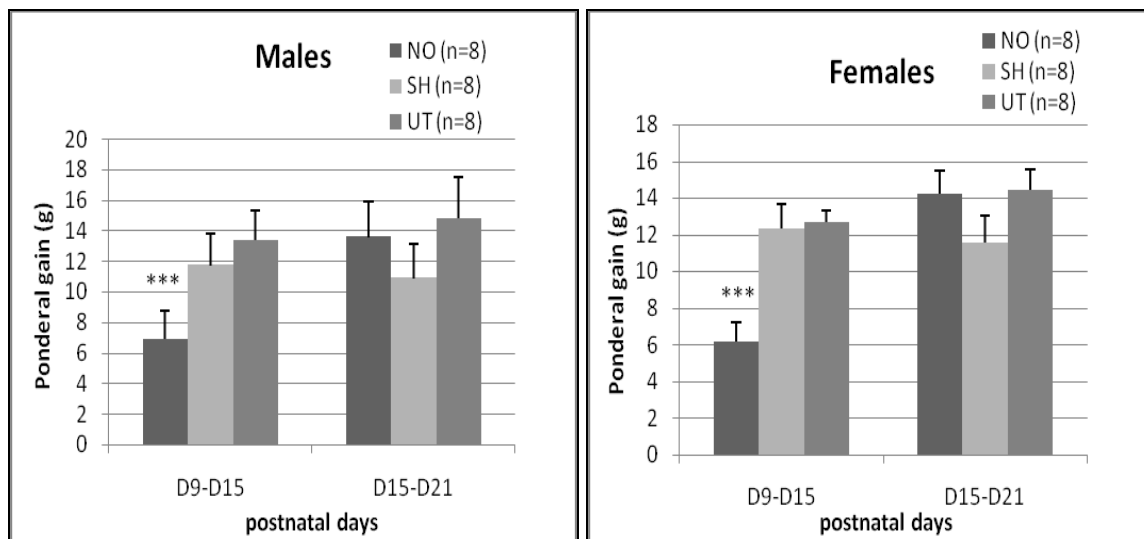


Figure2: Ponderal gain (g) in animals with nasal obstruction (NO) n=8 per sex versus untreated group (UT) n=8 per sex and sham group (SH) n=8 per sex, from 9 to 21 postnatal days. P: significance level; NS: not significant ($P > 0.05$), * significant ($P < 0.05$), ** very significant ($P < 0.01$), *** moresignificant ($P < 0.001$).

Two-choice situation: “nest sawdust vs. clean sawdust”:

24 hours after treatment animals who were exposed to nasal obstruction took significantly longer to make a choice (124.55 ± 20.93); (27.7 ± 2.97 in males, 12.6 ± 3.55 in females) and controls (18.28 ± 6.84 in females 15.52 ± 8.64 in females) ($F = 18.242$, $P < 0.0001$ in males and $F = 18.708$, $P < 0.0001$ in females). This difference tends to disappear at D15 and D21. (F

= 16.28, P = 0.029) and (F = 12.96; P = 0.034) in females and on the 21st postnatal day in males (F = 14.54 , P = 0.29), (F = 13.69, P = 0.16) in females.

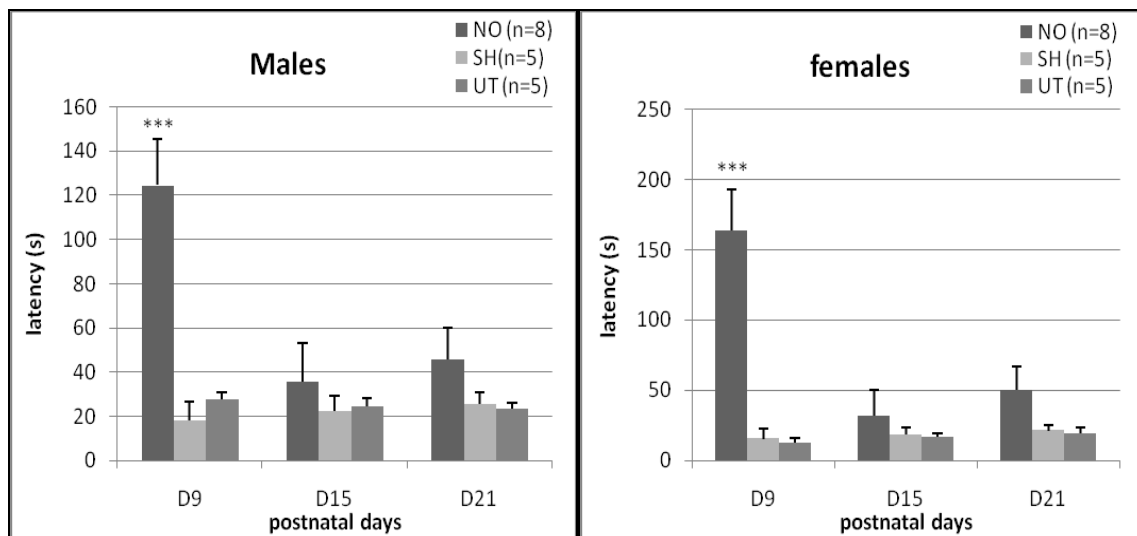


Figure3: Latency of the first choice (s) in animals with nasal obstruction (NO) n=8 per sex versus untreated group (UT) n=5 per sex and sham group (SH) n=5 per sex, from 9, 15 and 21 postnatal days. P: significance level; NS: not significant (P >0.05), * significant (P<0.05), ** very significant (P<0.01), *** more significant (P<0.001).

Choice of clean sawdust compartment:

The time spent in each type of sawdust differs significantly according to the experimental groups. For the "clean sawdust" compartment, whether in the males or females of the control and control batches, very little or no time is recorded at D9, D15 and D21. While young people exposed to nasal filling make a choice close to the random choice (choice of clean sawdust) where they spend the most time, it is maximal at day 9 that it is in males (210.625 ± 3.95) or in females (180.45 ± 5.24), then tends to decrease to D15, in males (120.45 ± 4.56) and (131.54 ± 4.52) in females and on D21 in males (35.89 ± 3.954) and (27.34 ± 13.44) in females. Whatever the sex of the individuals ON on day 9 and day 15, there are very significant differences $p < 0.0001$ vs controls and controls. At D21 $p = 0.13$ in males and $p = 0.21$ in females.

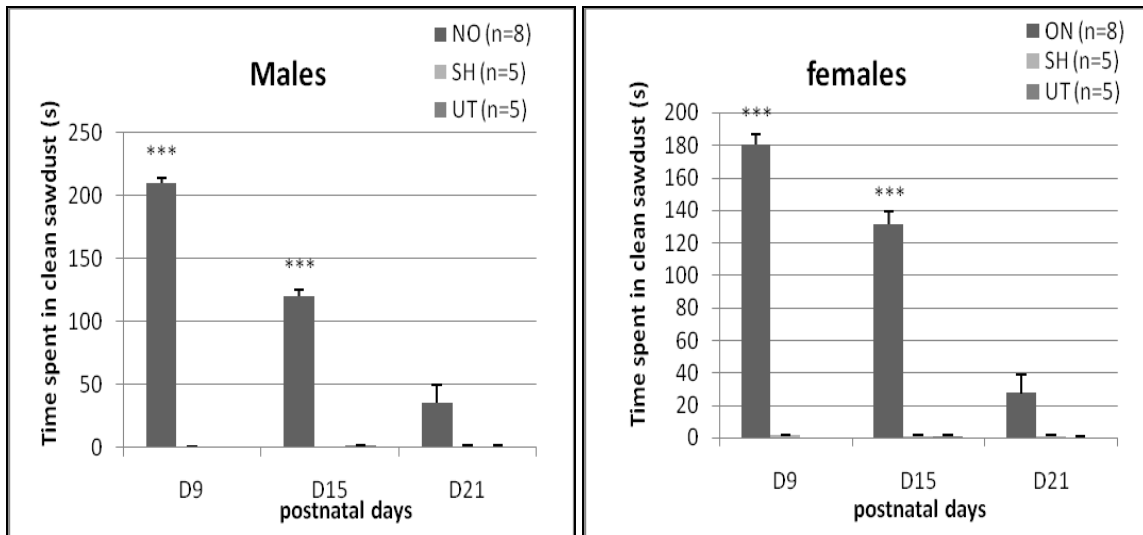


Figure4: Time (s) spent in Clean Sawdust (NS) in animals with nasal obstruction (NO) n=8 per sex versus untreated group (UT) n=5 per sex and sham group (SH) n=5 per sex, from 9,15 and 21 postnatal days. P: significance level; NS: not significant ($P > 0.05$), * significant ($P < 0.05$), **very significant ($P < 0.01$), *** moresignificant ($P < 0.001$).

Choice of nest sawdust compartment:

The time spent in the "sawdust" compartment is significantly lower in ON than in controls and controls. The average is (12.54 ± 3.94) in males and (21.54 ± 4.21) in females, whereas in control and control animals it is much higher ($P < 0.0001$). A significant difference in males ($F = 19.27$, $p < 0.0001$) and females ($F = 18.12$, $p < 0.0001$) was recorded at D15. There was no significant difference at this time in males and females ($F = 29.31$, $p = 0.45$) at day 21 ($F = 24.47$; $p = 0.34$). Control and control individuals distribute their time in a similar manner regardless of age or sex ($0.117 < P < 0.984$).

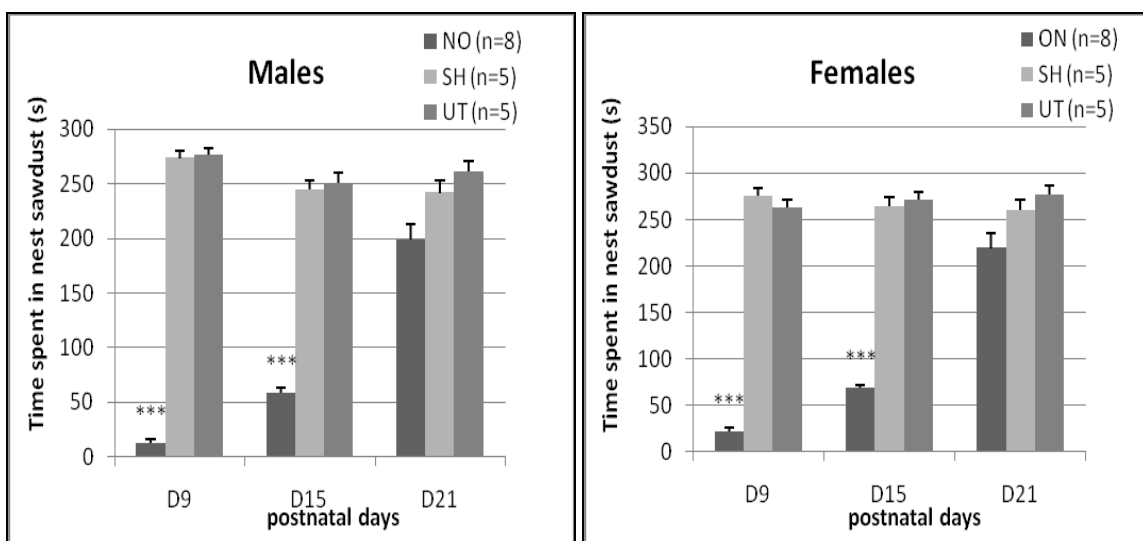


Figure5: Time (s) spent in Nest Sawdust (NS) in animals with nasal obstruction (NO) n=8 per sex versus untreated group (UT) n=5 per sex and sham group (SH) n=5 per sex, from 9,15

and 21 postnatal days. P: significance level; NS: not significant ($P>0.05$), * significant ($P<0.05$), **very significant ($P<0.01$), *** moresignificant ($P<0.001$).

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 [9] [10]. For example, vocalizations in the ultrasonic range have been reported to occur in young rodents moved away from the nest [11]. The pup isolation calls elicit searching and retrieval behaviors by the mother [12] and the number of calls can modify the mother's behavior [13]. As a high level of anxiety is known to enhance the rate of ultrasonic vocalizations [14], 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 [14]. The majority of total licking time is spent licking the pup's anogenital region, behavior that stimulates reflexive defecation and urination [16]. In addition to the influence of acoustic signals, anogenital licking is also strongly related to a pheromone present in the urine of the offspring [16]. 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. These 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 [18]. 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 [19]. 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 [20]. 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 [21], 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 [22] [23]. Mirich and Brunjes 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 [24]. This recovery time could explain the delay in the functional recovery of the olfactory abilities, although the external nostrils were reopened.

In conclusion, early nasal obstruction disturbed mother-young relationships and decreased the offspring's food intake. 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.

References

1. Blass EM, Teicher MH (1980) Suckling. *Science* 210: 15-22.
2. Sullivan RM (2003) Developing a sense of safety: the neurobiology of neonatal attachment. *Ann N Y Acad Sci* 1008: 122-131.
3. Sczerzenie V, Hsiao S (1977) Development of locomotion toward home nesting material in neonatal rats. *Dev Psychobiol* 10: 315-321.
4. Brunjes PC, Alberts JR (1979) Olfactory stimulation induces filial preferences for huddling in rat pups. *J Comp Physiol Psychol* 93: 548-555.
5. 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.
6. Seiden AM, Duncan HJ (2001) The diagnosis of a conductive olfactory loss. *Laryngoscope* 111: 9-14.

7. 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.
8. Waguespack AM, Reems MR, Butman ML, Cherry JA, Coppola DM (2005) Naris occlusion alters olfactory marker protein immunoreactivity in olfactory epithelium. *Brain Res* 1044: 1-7.
9. Hofer, M.A., Shair, H.N., 1992. Ultrasonic vocalization by rat pups during recovery from deep hypothermia. *Dev. Psychobiol.* 25, 511-528.
10. 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.
11. 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.
12. 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.
13. Brudzynski, S.M., 2005. Principles of rat communication: quantitative parameters of ultrasonic calls in rats. *Behav. Genet.* 35, 85-92.
14. Naito, H., Inoue, M., Makino, J., 2000. Ultrasonic isolation calls in genetically high- and low-emotional rat pups. *Exp. Anim.* 49, 289-294.
15. 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.
16. Moore, C.L., 1982. Maternal behavior of rats is affected by hormonal condition of pups. *J. Comp. Physiol. Psychol.* 96, 123-129.
17. 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.
18. Blass, E.M., Teicher, M.H., 1980. Suckling. *Science* 210, 15-22.
19. 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.
20. Kalogjera, L., Pegan, B., Petric, V., 1991. Compensatory mechanisms induced by high oropharyngeal airway resistance in rats. *Acta Otolaryngol.* 111, 384-388.
21. 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.
22. 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.
23. Brunjes, P.C., 1994. Unilateral naris closure and olfactory system development. *Brain Res. Brain Res. Rev.* 19, 146-160.
24. Mirich, J.M., Brunjes, P.C., 2001. Activity modulates neuronal proliferation in the developing olfactory epithelium. *Brain Res. Dev. Brain Res.* 127, 77-80.

Annexe 3 :

Advances in Animal and Veterinary Sciences

Dorbani et al., Adv. Anim. Vet. Sci. 7(5): x-x

Effects of nasal obstruction on hormonal and immune functions in *wistar* rats

Asma Dorbani*, Abdelmadjid Bairi and Abdelkrim Tahraoui

Applied Neuroendocrinology Laboratory, Department of Biology, Faculty of Science, University Badji Mokhtar BP 12 23000, Annaba, Algeria.

Received | November 04, 2018; Accepted | February 18, 2019; Published | March xx, 2019.

Abstract

Olfaction occurs in many areas such as reproduction, diet, social behavior, or the detection of predators. In order to know if the absence of olfaction could disrupt mammalian endocrine and immune functions, bilateral nasal obstruction (NO) was induced in young rats of the *Wistar* strain at the 8th postnatal day. Its consequences were examined 24 hours after the treatment (D9), at the end of the obstruction period (D15) and six days after the reopening of the nostrils (D21). Samples of the biological extracts were taken and our results show that the NO causes a stress which would disturb the development of the individual. At the endocrine level, the NO causes hormonal modifications which are generally more marked in the females (increase in the rate of ACTH). At the level of the immune system, NO leads to a decrease in the number of circulating leukocytes and lymphocytes. For the rat, nasal obstruction is therefore a multifactorial stressful situation.

Key words: Olfactory deprivation, Anxiety, Lymphocytes, ACTH, *Wistar*.

Introduction

The olfactory system is a sensory system specialized in the detection and processing of volatile chemical information, the odorant molecules.

Unlike vision, it is a relatively plastic sensory system. An unknown molecule can still be detected, even if the olfactory sensation is weak at the beginning, the olfactory system will develop later receptors to detect it more effectively (Duchamp-Viret, 2012).

Nasal obstruction causes a disturbance of the airflow passing through the nasal cavity. It is generally due to a decrease in the size of the nasal cavity of mechanical or functional origin. Although total nasal occlusion is a rare phenomenon, disruption of airflow in the nasal cavity is a common problem and its repercussion is usually underestimated (Vig, 1998). When the nasal cavities are obstructed, the central nervous system sends the motor effector structures motor commands to release a replacement airway. We then observe the establishment of an oral replacement to maintain the ventilatory function. The newly established oral breathing can be divided into two components: an absence of nasal breathing and a chronic opening of the mouth (Schlenker et al., 2000).

This transition is likely to disrupt all nasal functions and have many consequences locally and regionally or globally.

During the postnatal period, bilateral nasal obstruction may result in:

- Respiratory distress by altering the conditioning of the inspired air.
- Partial social deprivation by disrupting conspecific orientation.
- Nutritional disturbances by disrupting suckling orientation (breast milk is the only water source for the newborn).
- Thermal imbalance by disrupting orientation to the mother and nest (in nesting species only).

These different factors are known for their ability to stimulate the neuroendocrine response to stress. Bilateral nasal obstruction could therefore be a stressful multi-factorial situation. In the event that it actually results in the establishment of a stress response, the nasal obstruction would represent a chronic stressful situation, or a relatively moderate disturbance lasting for several days (Pacak et Palkovits, 2001).

As part of this study, all observations were focused on the consequences of nasal obstruction on endocrine and immune function. Some blood parameters were measures CBC, glucose and adrenocorticotrophic hormone (ACTH). We will see that by disturbing the breathing and the olfaction, the nasal obstruction could constitute a stressful multifactorial situation likely to disturb the development of certain peripheral physiological systems.

Materials and Methods

1. Biological material and animal care:

In the present study, we used *wistar* rats (*Rattus rattus*). Ten mixedsex litters were born in the laboratory of the university. All animals were housed in standard cages on a constant 12-h light/12-h dark cycle with controlled temperature and humidity and were given access to food and water ad libitum.

2. Nasal obstruction procedure and experimental groups:

At the age of 8 days, the litters were divided into three experimental groups. Untreated group (UT) was defined by the complete absence of manipulation (n=10). Sham group (SH) (n=10) and animals with nasal obstruction (NO) (n=16) were first anesthetized for a short period.

They were placed for few seconds in a glass bell containing a cotton wisp impregnated with ether. Once the litters were anesthetized, a bilateral nasal obstruction was performed on NO animals as previously described by Meisami (1976). 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 15. 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°C) for 1 h and they were then returned to the mothers.

3. Biological Samples:

After these different operations, the rats are sacrificed on day 9, others on day 15 and those remaining on day 21. Different biological extracts are taken from each individual: The blood samples are taken in EDTA tubes to analyze CBC (the cell blood count), the blood glucose is measured immediately with a glucometer. The blood taken with heparin is centrifuged at 1480 rpm for 10 minutes to obtain the serum. This was stored at -20 ° C until steroid hormonal (ACTH) assays were performed. The comparison will be made for all the parameters measured versus the sham and untreated groups.

4. Statistical analysis:

Data in the text and figure legends are means \pm standard errors for the indicated number (n) of animals. Statistical comparisons were made by analysis of variance (ANOVA) and differences were considered to be significant at $P < 0.05$. (Tukey–Kramer test, $P > 0.05$).

Results

1. Glucose:

In NO animals, blood glucose levels decreased significantly 24 hours after nostril obstruction and reached (0.41 ± 0.098) in males and (0.34 ± 0.055) in females. This drop in blood sugar is highly significant ($p < 0.0001$ vs sham and untreated group). In females, hypoglycemia persisted until day 15 (0.49 ± 0.14) and was very significant ($p = 0.012$). While in males, there is no significant difference. At D21, blood glucose levels are comparable to those of sham and untreated rats, whether in males (0.92 ± 0.04) or in females (1.13 ± 0.034). **Fig.1**

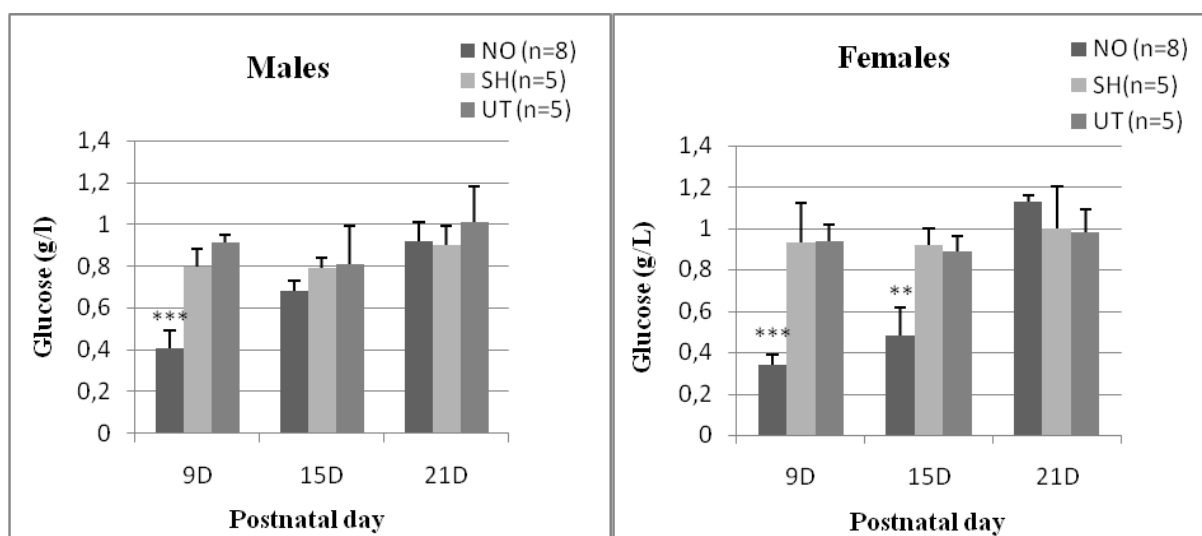


Fig.1: Effect of early nasal obstruction on blood glucose levels (g/L) in NO, sham and untreated rats at 9, 15 and 21 postnatal day.

2. ACTH (adrenocorticotrophic hormone) :

Regarding the ACTH plasma concentration, a significant difference between the experimental groups is detected at J9 ($F = 23.60$, $p < 0.0001$), J15 ($F = 27.41$, $p < 0.0001$) and J21 ($F = 7.96$, $p = 0.02$). Regardless of age, sham and untreated individuals have comparable ACTH concentrations in both females and males ($0.36 < p < 0.87$). On the other hand, animals exposed to nasal obstruction show a significant increase in plasma ACTH. In females, this elevation is observed 24 hours after the treatment (day 9: $p < 0.0001$ vs sham and untreated group), at the end of the nasal obstruction period (J15: $p < 0.0001$ vs sham and untreated) and is maintained until the 21st postnatal day, it reached a high value (2000 ± 201.4) (pg/ml)

compared to untreated ($1300 \pm 69,4$) (pg/ml) and sham groups ($1152,1 \pm 98,5$) (pg/ml) ($p < 0.0001$ vs sham and untreated). In males, the increase was significant on day 9 ($p = 0.0003$ vs sham group, $p = 0.0001$ vs untreated group) and on day 15 ($p = 0.0004$ vs sham, $p = 0.0002$ vs untreated) but not at J21 ($p = 0.19$ vs sham, $p = 0.14$ vs untreated).

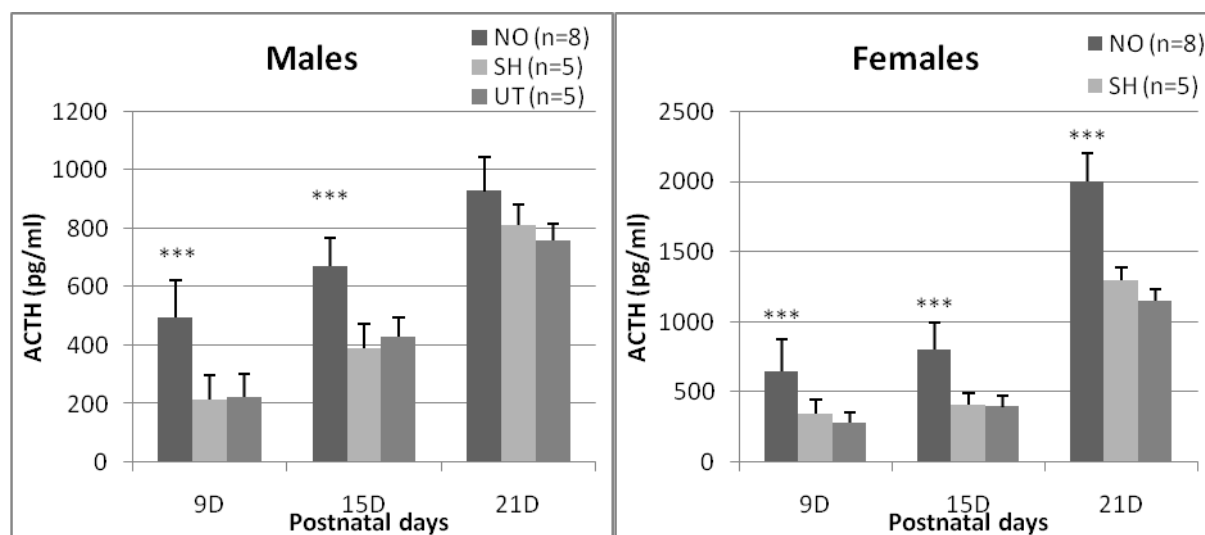


Fig. 2: effect of early nasal obstruction on adrenocorticotrophic hormone (ACTH) in experimental groups at 9, 15 and 21 days of age. *P*: significance level; NS: not significant ($P > 0.05$).

3. Cell blood count (CBC) :

The effect of nasal obstruction on hematological parameters in rats is presented in Tables 1 and 2. The results indicate that on some parameters measured at different periods of the experiment (9D, 15D and 21D), only two have varied significantly. In males, very significant changes were observed at the level of lymphocytes on day 9 (74.7 ± 5.22) versus (65.4 ± 5.21) for SH and (62.3 ± 1.21) for UT group, at day 15 (86 ± 2.22) against (71.12 ± 5.01) for SH and (73.51 ± 0.8) for UT group at day 21 (84.2 ± 2.97) for (75.1 ± 2.14) for SH and (69.4 ± 1.55) for UT. Mean monocyte cell concentrations were significant only at D9 (2.8 ± 0.19) versus (6.55 ± 0.55) for SH and (8.15 ± 0.02) for UT group.

Table 1: Evaluation of hematological parameters of experimental rats males at 9D, 15D and 21D.

Postnatal day	9D			15D			21D			<i>p</i>
Group	NO (n=8)	SH (n=5)	UT(n=5)	NO (n=8)	SH (n=5)	UT (n=5)	NO (n=8)	SH (n=5)	UT (n=5)	
NFS										
WG (10³/ul)	6,37±0,37	7,1±0,25	6,95±1,28	7,37±0,67	8,4±0,05	7,56±0,2	8,79±1,02	9 ,45±2,45	7,48±0,9	0,32 ns
RG(10⁶/ul)	8,94±0,95	9,71±1,05	8,29±1,87	11,24±0,7	10,8±1,47	8 ,32±0,09	10,29±0,3	11,54±1,8	9,70±0,11	0,46 ns
NEYT (%)	20,1±2,53	18,1±1,44	17,25±2,3	26±1,54	24,54±5,02	25,32±3,1	36,3±3,25	34 ,47±2,1	32,3±4,97	0,34ns
LYMPH (%)	74,7±5,22	65,4±5,21	62,3±1,21	86±2,22	71,12±5,01	73,51±0,8	84,2±2,97	75,1±2,14	69,4±1,55	0,017 **
MONO (%)	2,8±0,19	6,55±0,55	8,15±0,02	6,5±0,14	7,78±0,51	8,14±1,12	8,1±0,51	6,97±0,09	7,1±1,34	0,041 *
EO (%)	2,4±0,33	2,14±0,5	1,87±1,02	1,5±0,21	1,69±0,45	2,01±0,08	1,3±0,44	1,8±0,05	1,2±0,14	0,8ns

Hematological parameters values (Table 2) in rats indicate that in females, nasal obstruction significantly altered white blood cells at D15 (6.82 ± 0.01) against (12.3 ± 2.14).) for the SH lot and (13.54 ± 5.1) for the UT lot. This change is maintained until D21 (5.69 ± 0.12) against (9.97 ± 1.45) for the SH group (12.54 ± 4.2) for the UT group. The hematological parameters measured showed highly significant changes in lymphocyte levels, a rate of (43.3 ± 5.01) was recorded on day 9 for the NO group, (35.84 ± 2.7) for the control group and (37.85 ± 1.5) for the sham group, on day 15 the lymphocyte count of NO rats is (61.7 ± 8.54), (49.8 ± 11.21)

in SH and UT rats ($51,21 \pm 9,2$). At D21, there were variations for NO of (76.7 ± 2.87) versus (45.5 ± 5.1) for sham and (40.2 ± 7.5) for untreated group.

Table 2: Evaluation of hematological parameters of experimental rats females at 9D, 15D and 21D.

Postnatal day	9D			15D			21D			p
Group	NO(n=8)	SH(n=5)	UT(n=5)	NO(n=8)	SH (n=5)	UT(n=5)	NO(n=8)	SH (n=5)	UT(n=5)	
NFS										
WG ($10^3/\mu\text{l}$)	9,60±0,05	11,54±2,3	10,54±0,2	6,82±0,01	12,3±2,14	13,54±5,1	5,69±0,12	9,97±1,45	12,54±4,2	0,032 **
RG ($10^6/\mu\text{l}$)	9,74±1,21	8,78±3,25	10,54±0,9	8,88±1,21	9,32±2,01	9,45±3,12	10,44±0,4	9,47±0,19	10,61±1,7	0,445 ns
NEYT (%)	27,7±0,21	23,54±2,1	26,21±5,8	52,8±3,77	52,14±9,54	49,56±8,1	44,6±5,41	55,98±2,2	60,7±6,14	0,13 ns
LYMPH (%)	43,3±5,01	35,84±2,7	37,85±1,5	61,7±8,54	49,8±11,21	51,21±9,2	76,7±2,87	45,5±5,1	40,2±7,5	0,009 ***
MONO (%)	4,3±0,22	5,1±0,27	6,7±5,12	7,1±4,14	6,22±0,47	4,98±0,25	7,6±0,06	6,12±4,11	4,8±2,14	0,2ns
EO (%)	0,1±0,04	1,14±0,17	0,9±0,01	1,2±1,27	1,5±0,45	1,37±0,58	0,9±0,19	1,44±0,48	1,2±0,33	0,6ns

Discussion

Sensory signals play a key role in establishing and maintaining the two-way relationship between mother and offspring. From a young's point of view, olfaction is essential for the recognition of the mother and the udders (Blass et Teicher, 1980), nest (Brown, 1982), related or familiar partners (Kristensen *et al.*, 2001).

In *Wistar* rats exposed to nasal obstruction, weight loss is associated with hypoglycaemia that persists until reopening of the nostrils. Our study also demonstrates a significant increase in the ACTH level which is maintained even at D21 in females. The variations of the external

environment are sorted and "felt" essentially by the limbic system which sends this information to the hypothalamus via numerous nerve connections (Gray *et al.*, 1989).

Acute stress increases the amplitude and timing of CRF and AVP pulsations to the pituitary gland. The resulting ACTH peak then induces the synthesis of glucocorticoids by the adrenal glands. Depending on the nature, intensity and duration of the stressor, other factors such as angiotensin II or cytokines may potentiate the secretory action of the various interveners of the corticotropic axis (Chrousos, 1995). The negative feedback control exerted by the glucocorticoids on the different stages of the corticotropic axis then allows the extinction of the peak of secretion involved in response to the stressor.

Our results show a decrease in the level of lymphocytes in the blood, which lasts until the 21st postnatal day. Circulating cells may also be affected by undernutrition. In the cat, seven days of diet cause a drop in the number of leukocytes and circulating lymphocytes (Freitag *et al.*, 2000). These effects are not completely removed after seven days of replenishment. In adult rodents, nutritional deprivation leads to atrophy of the spleen, a reduction in the number of splenocytes and a decrease in their proliferative response (Howard *et al.*, 1999; Cunha *et al.*, 2003)

Indeed, our results show that a nasal obstruction performed from 8th to 15th postnatal day has consequences that last at least up to 21 days. Early nasal obstruction is therefore likely to have a more or less long-term impact. Early experiences, including stressful experiences, are known to have consequences that persist into adulthood. Thus, postnatal maternal separation and undernutrition can disrupt the neuroendocrine functions of the adult by modulating, for example, the activity of the corticotropic axis, the somatotropic axis or the secretion of insulin (Harel *et Tannenbaum*, 1995; Anisman *et al.*, 1998; Houdijk *et al.*, 2003). Interestingly, it appears that the immune damage observed following exposure to conventional stressors (electric shock, physical stress, experimentation by the experimenter, forced swimming or

running, etc.) is rapidly reversible after stopping the stressful situation (Shurin et al., 1994; Dhabhar et al., 1995). In contrast, exposure to social stressors (maternal separation in the young or social conflict in the adult male) appears to have long-term immune consequences such as a persistent reduction in T-cell proliferation (Stefanski et Engler, 1999).

Conclusion

The experimental work outlined in this article shows that early nasal obturation disrupts the individual's balance. This procedure nevertheless constitutes a multi-factorial situation and it appears difficult to understand the interactions and the relative importance of the various factors. These can act synergistically or antagonistically, systemically or specifically to adapt the individual to the new constraints of the environment.

References Bibliographiques

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.

Blass, E.M., Teicher, M.H., 1980. Suckling. *Science* 210, 15-22.

Brown, R.E., 1982. Preferences of pre- and post-weanling Long-Evans rats for nest odors. *Physiol. Behav.* 29, 865-874.

Chrousos, G.P., 1995. The Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis and Immune-Mediated Inflammation. *N. Engl. J. Med.* 332:1351-1362.

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.

- 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.
- Duchamp-Viret ; P., Chaput M.A., Duchamp A., 1999.** Odor response properties of rat olfactory receptor neurons. *Science* 284:2171–2174.
- 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.
- Gray, C.M., König, P., Engel, A.K., and Singer, 1989.** W. Oscillatory responses in cat visual cortex exhibit inter-columnar synchronization which reflects global stimulus properties. *Nature.* 1989; 338: 334-337.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.

- 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.
- Pacak, K., Palkovits, M., 2001.** Stressor specificity of central neuroendocrine responses: implications for stress-related disorders. *Endocr. Rev.* 22, 502-548.
- 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.
- 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.
- Stefanski, V., Engler, H., 1999.** Social stress, dominance and blood cellular immunity. *J. Neuroimmunol.* 94, 144-152.
- Vig, K.W., 1998.** Nasal obstruction and facial growth: the strength of evidence for clinical assumptions. *Am. J. Orthod. Dentofacial Orthop.* 113, 603-611.