

Sciences de la vie et de la santé

UNIVERSITÉ DE FRANCHE-COMTÉ  
UFR Sciences et Techniques

École Doctorale : ED 369 - Environnement, Santé, Société

**Effets de l'exposition à des substances volatiles  
toxiques sur les neuroépithéliums olfactif  
principal et voméronasal:**

*Approches comportementale, histologique et  
immunohistochimique chez la souris.*

Présentée par Gaëlle BURON le 14 mai 2009

Laboratoire de Neurosciences – Besançon

**Jury**

---

<b>Directeur de Thèse</b>	G. BRAND MC-HDR ( <i>Université de Franche-Comté</i> )
<b>Co-Directeur</b>	G. POURIÉ MC ( <i>Université de Franche-Comté</i> )
<b>Rapporteurs</b>	P. VIRET-DUCHAMP Directrice de Recherche CNRS ( <i>Université Claude Bernard, Lyon</i> ) G. SICARD Chargé de Recherche CNRS- HDR ( <i>CESG, Dijon</i> )
<b>Examineurs</b>	F. FÉRON Professeur des Universités-HDR ( <i>Faculté de Médecine, Marseille</i> ) D. DESOR Professeur des Universités ( <i>Université de Nancy</i> )

---

# Remerciements

Je tiens à adresser mes sincères remerciements à:

**Gérard Brand,**

*Qui m'a fait découvrir le domaine des neurosciences lors de mon Master, puis qui m'a permis de poursuivre mes recherches sur l'olfaction et d'affiner mes connaissances théoriques et techniques lors de cette thèse. Sa disponibilité, la confiance et la liberté qu'il m'a accordées m'ont été de précieuses qualités au cours de ces années,*

**Grégory Pourié,**

*Pour ses remarques constructives et son aide sur le plan technique,*

**Les membres du jury,**

*Pour avoir accepté et pris le temps d'évaluer ce travail de thèse,*

**Les membres du laboratoire de chrono-environnement de Besançon**

*Pour leur accueil, et leurs compétences techniques,*

**Pierre-Yves Risold**

*Du laboratoire estrogènes, expression génique et pathologies du système nerveux central de Besançon, pour sa gentillesse et ses compétences scientifiques,*

**Didier Trotier**

*De l'unité NOPA de Jouy-en-Josas pour son accueil, et pour m'avoir enseigné la dissection de l'organe voméronasal, technique essentielle à mon travail de thèse.*

**Tous les membres du laboratoire de Neurosciences de Besançon,**

*Maîtres de conférence, professeurs, technicienne, secrétaire et doctorants qui ont contribué à cette thèse, et en particulier Emmanuel Galliot, qui, avec beaucoup de patience, a passé de nombreuses heures à réaliser la majorité des illustrations figurant dans ce manuscrit.*

**Ma famille et mes amis.**

# Sommaire

Introduction..... p1

## **CHAPITRE I : Données bibliographiques.....p7**

### **Partie 1 : Le système olfactif principal .....p8**

I- Nature des stimuli olfactifs..... p8

II- Cavité nasale et muqueuse olfactive.....p9

2-1 Le mucus.....p10

2-2 L'épithélium olfactif.....p10

2-3 Les neurones récepteurs olfactifs.....p12

2-4 La sous muqueuse.....p14

III- Transduction du signal olfactif.....p15

IV- Les bulbes olfactifs.....p16

V- Les voies centrales olfactives.....p18

VI- Conclusion.....p19

### **Partie 2 : Le système olfactif accessoire.....p20**

I- Généralités.....p20

II- Localisation et structure de l'organe voméronasal..... p20

III- Accès des stimuli à l'organe voméronasal..... p22

IV- Les récepteurs de l'organe voméronasal.....p23

V- Mécanismes de transduction des signaux..... p24

VI- Le bulbe olfactif accessoire.....p25

VII- Projections centrales..... p26

VIII- Conclusion.....p28

### **Partie 3 : Le système trigéminal..... p29**

I- Nature des stimuli.....p29

II- Rôle du système trigéminal.....p29

III- Anatomie..... p30

3-1- Niveau périphérique..... p30

3-2- Niveau central.....p31

## **Partie 4 : Mécanismes de protection des voies olfactives et modes d'action des substances toxiques..... p32**

<u>I- Mécanismes de protection de l'épithélium olfactif.....</u>	p32
1- Sécrétions de la muqueuse olfactive.....	p32
2- Enzymes de détoxification présentes dans la muqueuse olfactive.....	p33
2-1-Principale enzyme de phase 1 : le cytochrome P450.....	p33
2-2- Enzymes de phase 2.....	p34
a/ Les glutathion S-transférases .....	p34
b/ Les UDP glucuronyl transférases.....	p34
c/ Les sulfates transférases.....	p34
<u>II- Mécanismes de protection de l'organe voméronasal.....</u>	p35
1- Enzymes de détoxification présentes dans l'organe voméronasal.....	p35
a/ Enzyme de phase1 : le cytochrome P450.....	p35
b/ Enzyme de phase 2 : les glutathion S-tranfèreses.....	p35
c/ Autres enzymes de phase 2.....	p35
<u>III- Rôle des enzymes nasales.....</u>	p35
3-1- Protection des tissus.....	p35
3-2- Modification des stimuli olfactifs.....	p36
3-3- Métabolites et toxicité.....	p36
IV- Conclusion.....	p37

## **Partie 5 : Polluants et leurs effets au niveau de la cavité nasale.....p38**

<u>I- Sources des polluants.....</u>	p38
<u>II- Classification.....</u>	p39
<u>III- Caractéristiques des polluants étudiés.....</u>	p40
3-1 Les solvants.....	p40
a/ Acétone.....	p42
b/ Pyridine.....	p42
c/ Toluène.....	p43
3-2 Un polluant atmosphérique : le dioxyde de carbone (CO <sub>2</sub> ).....	p43
3-3 Récapitulatif des propriétés des polluants étudiés.....	p44
<u>IV- Effets des polluants sur la cavité nasale chez le rongeur.....</u>	p46
4-1 Effets sur l'épithélium olfactif principal et facteurs de variation.....	p46
a/ Gaz et vapeur.....	p47
b/ Solvants.....	p47

4-2 Etudes toxicologiques menées chez l'animal.....	p48
a/ Acétone.....	p49
b/ Pyridine.....	p50
c/ Toluène.....	p50

## **CHAPITRE II : Données Expérimentales.....p53**

### **Partie 1 : Matériel et Méthode.....p54**

#### **A : Protocoles d'exposition..... p54**

##### I- Animaux..... p54

##### II- Conditions d'exposition..... p54

###### 2-1- Analyses chromatographiques.....p55

###### 2-2- Mesures chromatographiques ..... p56

###### a/ Acétone..... p56

###### b/ Pyridine..... p57

###### c/ Toluène..... p58

###### d/ CO<sub>2</sub>..... p58

###### 2-3- Expositions de courte durée..... p59

###### 2-4- Expositions de longue durée..... p59

##### III- Protocole d'exposition..... p60

###### 3-1- Expositions de courte durée..... p60

###### a/ Exposition à des solvants..... p60

###### b/ Exposition au CO<sub>2</sub>..... p61

###### 3-2- Expositions de longue durée..... p62

###### a/ Exposition à des solvants..... p62

###### b/ Exposition au CO<sub>2</sub>..... p62

#### **B : Tests d'évaluation du comportement d'approche/évitement des souris vis-à-vis de sources odorantes.....p63**

##### I- Tests comportementaux réalisés avec les solvants..... p63

##### II- Tests comportementaux réalisés avec le CO<sub>2</sub>..... p65

##### III- Tests contrôles..... p66

##### IV- Traitement statistique des données..... p67

#### **C : Mesures histologiques sur l'épithélium olfactif..... p68**

##### I- Prélèvement de l'épithélium olfactif..... p68

1-1- Fixation.....	p68
1-2- Inclusion en paraffine.....	p68
1-3- Coupe de blocs.....	p69
1-4- Montage sur lame.....	p69
1-5- Coloration et montage pour conservation.....	p69
1-6- Observation des coupes.....	p70
<u>II- Traitement statistique des données.....</u>	p70
<u>III- Récapitulatif du protocole d'histologie.....</u>	p71
<b><u>D : Mesures immunohistochimiques sur l'épithélium olfactif.....</u></b>	<b>p72</b>
<u>I- Protocole.....</u>	p72
<u>II- Observation des lames.....</u>	p73
<u>III- Traitement statistique des données.....</u>	p73
<b><u>E : Mesures histologiques sur l'organe voméronasal.....</u></b>	<b>p74</b>
<u>I- Protocole.....</u>	p74
<u>II- Mesures morphométriques.....</u>	p74
<u>III- Traitement statistique des données.....</u>	p75
<b>Partie 2 : Effets de l'exposition sur une courte durée à des polluants sur le système olfactif principal de la souris : évaluations comportementales et histologiques.....</b>	<b>p76</b>
<u>I- Evaluations comportementales.....</u>	p77
1-1- Exposition à l'acétone.....	p77
a/ Test d'approche/évitement vis-à-vis de l'acétone (vs eau).....	p77
b/ Test d'approche/évitement vis-à-vis du butanol (vs eau).....	p77
c/ Test de sensibilité d'approche/évitement vis-à-vis de l'urine (vs eau)...	p78
d/ Résultats des évaluations comportementales avant, pendant et après l'exposition à l'acétone sur une courte durée.....	p78
1-2- Exposition à la pyridine.....	p79
a/ Test d'approche/évitement vis-à-vis de la pyridine (vs eau).....	p79
b/ Test d'approche/évitement vis-à-vis du butanol (vs eau).....	p79
c/ Test d'approche/évitement vis-à-vis de l'urine (vs eau).....	p79
d/ Résultats des évaluations comportementales avant, pendant et après l'exposition à la pyridine sur une courte durée.....	p80
1-3- Exposition au CO <sub>2</sub> (5h).....	p81
a/ Test d'approche/évitement vis-à-vis du triméthylthiazoline (vs eau)...	p81
b/ Test d'approche/évitement vis-à-vis de l'urine ( vs eau).....	p81

c/ Test d'approche/évitement : TMT vs urine.....	p82
d/ Résultats des évaluations comportementales avant, pendant et après l'exposition au CO <sub>2</sub> sur une courte durée.....	p83
<b>II- Mesures Histologiques.....</b>	<b>p84</b>
2-1- Exposition à l'acétone.....	p84
a/ Mesures histologiques globales.....	p84
b/ Mesures histologiques par zones de l'épithélium olfactif.....	p85
c/ Résultats des évaluations histologiques avant, pendant et après l'exposition à l'acétone sur une courte durée.....	p87
2-2- Exposition à la pyridine.....	p89
a/ Mesures histologiques globales.....	p89
b/ Mesures histologiques par zones de l'épithélium olfactif.....	p90
c/ Résultats des évaluations histologiques avant, pendant et après l'exposition à la pyridine sur une courte durée.....	p92
2-3- Exposition au CO <sub>2</sub> (5h).....	p94
a/ Mesures histologiques globales.....	p94
b/ Mesures histologiques par zones de l'épithélium olfactif.....	p95
c/ Résultats des évaluations histologiques avant, pendant et après l'exposition au CO <sub>2</sub> sur une courte durée.....	p97
<b>III- Récapitulatif des résultats obtenus lors des expositions de courte durée.....</b>	<b>p100</b>
 <b>Partie 3 : Influence de la durée et de la concentration d'exposition sur l'épithélium olfactif principal des souris.....</b>	
<b>p104</b>	
<b>I- Evaluations comportementales.....</b>	<b>p105</b>
1-1- Exposition à la pyridine.....	p105
a/ Test d'approche/évitement vis-à-vis de la pyridine (vs eau).....	p105
b/ Test d'approche/évitement vis-à-vis du butanol (vs eau).....	p106
c/ Test d'approche/évitement vis-à-vis de l'urine (vs eau).....	p106
d/ Résultats des évaluations comportementales avant, pendant et après l'exposition à la pyridine sur une longue durée.....	p107
1-2- Exposition au toluène.....	p108
a/ Test d'approche/évitement vis-à-vis du toluène (vs eau).....	p108
b/ Test d'approche/évitement vis-à-vis du butanol (vs eau).....	p109
c/ Test d'approche/évitement vis-à-vis de l'urine (vs eau).....	p109
d/ Résultats des évaluations comportementales avant, pendant et après l'exposition au toluène sur une longue durée.....	p110
1-3- Exposition au CO <sub>2</sub> (12h).....	p111
a/ Test d'approche/évitement vis-à-vis du triméthylthiazoline (vs eau)....	p111

b/ Test d'approche/évitement vis-à-vis du butanol (vs eau).....	p111
c/ Test d'approche/évitement vis-à-vis de l'urine (vs eau).....	p112
d/ Résultats des évaluations comportementales avant, pendant et après l'exposition au CO <sub>2</sub> sur une longue durée.....	p112
<u>II- Mesures histologiques.....</u>	p113
2-1- Exposition à la pyridine.....	p113
a/ Mesures histologiques globales.....	p113
b/ Mesures histologiques par zones de l'épithélium olfactif.....	p114
c/ Résultats des évaluations histologiques avant, pendant et après l'exposition à la pyridine sur une longue durée.....	p116
2-2- Exposition au toluène.....	p118
a/ Mesures histologiques globales.....	p118
b/ Mesures histologiques par zones de l'épithélium olfactif.....	p119
c/ Résultats des évaluations histologiques avant, pendant et après l'exposition au toluène sur une longue durée.....	p121
2-3 Exposition au CO <sub>2</sub> (12h).....	p123
a/ Mesures histologiques globales.....	p123
b/ Mesures histologiques par zones de l'épithélium olfactif.....	p124
c/ Résultats des évaluations histologiques avant, pendant et après l'exposition au CO <sub>2</sub> sur une longue durée.....	p126
<u>III- Récapitulatif des résultats obtenus lors des expositions de longue durée.....</u>	p129
<b>Partie 4 : Mesures immunohistochimiques sur l'épithélium olfactif principal de souris soumis à une exposition à des polluants.....</b>	<b>p132</b>
<u>I- Expositions de courte durée.....</u>	p133
1-1- Exposition à l'acétone.....	p133
1-2- Exposition à la pyridine.....	p134
1-3-Exposition au CO <sub>2</sub> (5h).....	p135
<u>II- Expositions de longue durée.....</u>	p137
2-1- Exposition à la pyridine.....	p137
2-2- Exposition au toluène.....	p138
2-3- Exposition au CO <sub>2</sub> (12h).....	p139
<u>III- Récapitulatif.....</u>	p141

## **Partie 5 : Effets de l'exposition à des polluants sur le système olfactif accessoire de la souris : mesures histologiques sur l'organe voméronasal..... p143**

### I- Expositions de courte durée.....p144

#### 1-1- Exposition à l'acétone..... p144

a/ Epaisseur et nombre de cellules dans la zone médiane de l'épithélium de l'organe voméronasal (cellules matures).....p144

b/ Epaisseur de l'épithélium de l'organe voméronasal dans les zones de prolifération cellulaire (zones supérieure et inférieure).....p145

#### 1-2- Exposition à la pyridine.....p146

a/ Epaisseur et nombre de cellules dans la zone médiane de l'épithélium de l'organe voméronasal (cellules matures).....p146

b/ Epaisseur de l'épithélium de l'organe voméronasal dans les zones de prolifération cellulaire (zones supérieure et inférieure).....p147

#### 1-3- Exposition au toluène.....p148

a/ Epaisseur et nombre de cellules dans la zone médiane de l'épithélium de l'organe voméronasal (cellules matures).....p148

b/ Epaisseur de l'épithélium de l'organe voméronasal dans les zones de prolifération cellulaire (zones supérieure et inférieure).....p149

#### 1-4- Exposition au CO<sub>2</sub> (5h)..... p150

a/ Epaisseur et nombre de cellules dans la zone médiane de l'épithélium de l'organe voméronasal (cellules matures).....p150

b/ Epaisseur de l'épithélium de l'organe voméronasal dans les zones de prolifération cellulaire (zones supérieure et inférieure).....p151

### II- Exposition de longue durée : exemple du CO<sub>2</sub> (12h)..... p153

a/ Epaisseur et nombre de cellules dans la zone médiane de l'épithélium de l'organe voméronasal (cellules matures).....p153

b/ Epaisseur de l'épithélium de l'organe voméronasal dans les zones de prolifération cellulaire (zones supérieure et inférieure).....p154

### III- Récapitulatif.....p156

## **CHAPITRE III : Conclusion-Discussion et Perspectives..... p158**

### Références bibliographiques.....p172

### Annexes..... p191

# **Introduction**

Dans le règne animal, les systèmes sensoriels sont essentiels à l'adaptation et à la survie des organismes car ils apportent des informations sur le milieu environnant et leur permet de créer une représentation interne du monde extérieur. En ce sens, les mécanismes de perception sensoriels constituent la base de l'apprentissage, de la mémoire et du comportement. D'un point de vue évolutif, les modalités chimiques de perception sont les plus anciennes et le rôle de l'olfaction dans les processus adaptatifs est primordial. Longtemps négligée par la communauté scientifique, l'olfaction connaît depuis quelques années un regain d'intérêt. En effet, de multiples investigations scientifiques ont fourni de nouvelles données sur la structure et la fonction des récepteurs présents dans la cavité nasale à divers niveaux d'analyse - structurale, cellulaire et moléculaire - grâce à des découvertes dans des disciplines variées telles que la pharmacologie, les neurosciences ou la toxicologie.

Les animaux discriminent et reconnaissent de nombreux signaux chimiques présents dans leur environnement qui affectent profondément leur comportement. Ces signaux chimiques leur fournissent des informations essentielles qui modulent de multiples fonctions intégratives, telles que les régulations physiologiques, les réponses émotionnelles (anxiété, peur...), les fonctions reproductives (comportements sexuel et maternel...), les comportements sociaux (reconnaissance des conspécifiques, des prédateurs...) et la prise alimentaire. En outre, les animaux produisent souvent une large variété de molécules dans leur environnement, pouvant être soit des signaux chimiques spécifiques ou des produits issus de procédés métaboliques, soit des molécules odorantes. Ces molécules, soit de petites tailles et volatiles, soit des protéines souvent adsorbées ou peu volatiles, fournissent de nombreuses informations sur l'organisme émetteur, tels que le genre, l'âge, l'état de santé et l'état reproductif. Les signaux chimiques sont détectés par des cellules fortement spécialisées, des neurones sensoriels organisés en systèmes structurellement et fonctionnellement séparés au sein de la cavité nasale. Généralement, deux systèmes sont distingués : le système olfactif principal localisé dans la partie postérieure de la cavité nasale, et le système olfactif accessoire, nommé également système voméronasal, situé dans la partie antérieure de la cavité nasale et dont l'organe sensoriel, l'organe voméronasal, est logé dans une capsule cartilagineuse près du septum nasal. L'épithélium du système olfactif principal a des fonctions généralistes et il est responsable de la détection et de la discrimination d'une myriade de composés volatiles odorants, tandis que l'organe voméronasal a pour rôle principal la détection de substances véhiculant des informations spécifiques concernant l'espèce, le genre et l'identité de l'animal, ces signaux

chimiques sont généralement dénommés phéromones. Cependant, des études récentes ont remis en cause la ségrégation fonctionnelle de ces deux systèmes chimiosensoriels longtemps admise, et il apparaît alors que le système olfactif principal est capable de détecter des phéromones, tandis que le système olfactif accessoire peut être sensible à des molécules odorantes. Outre ces deux systèmes, le système trigéminal, le nerf terminal, l'organe septal de Masera et le ganglion de Gruenberg ont des fonctions sensorielles dans la cavité nasale. Dans ce travail de thèse, seuls le système olfactif principal et le système olfactif accessoire feront l'objet d'investigations.

L'odorat, outre le fait d'intervenir dans les relations sociales et dans la recherche de nourriture, a une fonction capitale dans la prévention de l'organisme vis-à-vis d'éléments potentiellement dangereux présents dans l'air environnant. La situation anatomique des systèmes chimiosensoriels les rend vulnérables aux agents toxiques inhalés puisque la cavité nasale est le premier site à être en contact avec l'air inspiré. En raison de leurs fonctions, des dommages sur ces systèmes peuvent avoir des conséquences considérables pour un individu. L'altération ou la perte des capacités olfactives peuvent survenir lors d'exposition accidentelle, ou lors d'exposition à de faibles concentrations en agents xénobiotiques toxiques. De nombreuses études portent sur les effets néfastes de l'exposition (par inhalation ou par ingestion) de produits potentiellement toxiques sur l'organisme. En effet, une quantité croissante de substances chimiques est utilisée en milieu industriel, dans le cadre d'utilisation domestique, ou lors de travaux en laboratoire, et les recherches visent à déterminer leurs effets à différents niveaux de l'organisme, par exemple au niveau des organes (comme le foie, les reins) ou au niveau du système nerveux central (comme l'évaluation des performances mnésiques). Cependant, si la plupart des travaux se sont intéressés aux effets de l'inhalation de polluants atmosphériques sur le système respiratoire, les modifications sur la chimioréception nasale ont été moins étudiées. La première étude menée en conditions contrôlées sur les effets de substances toxiques sur le système olfactif a été publiée en 1983 (Kerns *et al.*, 1983). Les résultats ont montré que l'exposition par inhalation sur le long terme à de fortes concentrations en formaldéhyde induisait des tumeurs nasales chez les rongeurs de laboratoire. L'exposition à des substances volatiles toxiques à des niveaux suffisants pour induire des dommages des fonctions olfactives apparaissent souvent chez l'Homme par accident et les effets à long terme de l'inhalation de composés toxiques sur les systèmes chimiosensoriels sont encore relativement peu connus. Les composés toxiques peuvent affecter les fonctions olfactives soit directement, en altérant l'épithélium sensoriel, soit indirectement, en provoquant des

irritations du passage nasal ou en bloquant le flux d'air parvenant à l'épithélium olfactif. Si quelques études ont montré des effets délétères de l'exposition par inhalation de certaines substances, le nombre de composés chimiques actuellement testés pour leur toxicité olfactive potentielle reste cependant faible en comparaison de la quantité importante de produits chimiques utilisés dans le milieu industriel. En outre, les données toxicologiques concernant le système olfactif accessoire sont quasiment inexistantes. Une seule étude menée sur les effets de l'inhalation d'ammoniac sur le système olfactif accessoire du lapin a été trouvée dans la littérature (Gaafar *et al.*, 1998) et montre une hyperplasie des cellules de soutien, ainsi qu'une perte de neurones voméronasaux de l'épithélium de l'organe voméronasal.

Les études toxicologiques réalisées suite à l'inhalation de solvants ou de gaz et concernant les grands systèmes physiologiques - respiratoire, digestif, et nerveux notamment - montrent des atteintes très diversifiées en fonction du type de molécules impliquées. Suivant les cas, le degré de sévérité des troubles observés s'échelonne d'effets inexistantes ou mineurs à des effets majeurs susceptibles de mettre en cause l'intégrité de tel ou tel système et qui peuvent s'avérer irréversibles. En revanche, les études toxicologiques qui portent sur la cavité nasale et particulièrement sur l'épithélium olfactif principal montrent des effets délétères systématiques au niveau histologique, généralement accompagnés d'atteintes fonctionnelles liées à la sensibilité et à la réactivité aux odeurs. **La première hypothèse** de ce travail de thèse est donc de **confirmer** que l'inhalation de substances volatiles toxiques - à partir d'un certain seuil d'exposition - entraîne des effets inévitables sur le système olfactif périphérique, et de **démontrer** que ces effets peuvent être différents en fonction des molécules considérées, dans le cas présent, la pyridine, l'acétone, le toluène et le CO<sub>2</sub>. Pour chaque molécule, se pose la question - classique en toxicologie - de l'existence d'un effet dose-dépendant lié à la concentration et/ou à la durée d'exposition. Les rares études publiées qui ont abordé cette question au niveau de l'épithélium olfactif semblent montrer que contrairement aux autres systèmes physiologiques, le système olfactif périphérique présenterait - à partir d'un certain seuil d'exposition aux substances volatiles toxiques - des modifications relativement semblables quelles que soient les conditions d'exposition. **La seconde hypothèse** de ce travail est donc de **vérifier** par la comparaison de conditions d'expositions différentes que tel est bien le cas. Toutefois, il est probable que la cinétique d'évolution des effets puisse être différente au cours du temps. Pour corroborer cette hypothèse, des analyses répétées à intervalles réguliers, pendant les périodes d'expositions et pendant les périodes de post-expositions, comparativement aux

observations réalisées avant exposition, seront conduites. Ces mesures répétées serviront également à **la troisième hypothèse** de ce travail qui **postule** que les atteintes histologiques ne sont pas obligatoirement corrélées aux modifications fonctionnelles de réactivité aux odeurs, mesurées ici par des tests comportementaux. En effet, l'épithélium olfactif est constitué de nombreux types cellulaires qui peuvent être affectés différemment par l'exposition aux molécules volatiles toxiques et la réalisation de la transduction olfactive dépend d'abord de la présence et de l'intégrité fonctionnelle des neurorécepteurs matures. Ainsi, au-delà de l'étude histologique des deux principaux paramètres relatifs à la structure de l'épithélium olfactif - épaisseur et nombre de cellules - des mesures immunohistochimiques quantifieront le nombre de neurones olfactifs matures et le nombre de cellules basales en prolifération. Si très peu d'études ont porté sur l'évaluation de ces paramètres, il est toutefois possible de poser l'hypothèse qu'une atteinte spécifique des neurones récepteurs matures (liée à une diminution de la réactivité comportementale aux odeurs) pendant l'exposition devrait s'accompagner d'une prolifération des cellules basales visant à assurer la régénération neuronale. Cette régénération devrait conduire lors des périodes de post-exposition à un recouvrement de l'intégrité de l'épithélium olfactif, comme c'est le cas lors d'anosmies transitoires provoquées par injection de sulfate de zinc dans la cavité nasale. En revanche, si les cellules basales s'avèrent être également touchées lors de l'exposition aux substances volatiles toxiques, le retour à l'intégrité de l'épithélium pourrait être compromis. Enfin, **la quatrième hypothèse** de ce travail repose sur l'idée que la vulnérabilité de l'épithélium olfactif est en partie due à sa position anatomique qui le met directement en contact avec l'air inhalé. Pour mettre à l'épreuve cette hypothèse, une analyse comparative sera menée avec un autre épithélium neurosensoriel de structure très semblable - également présent dans la cavité nasale - l'organe voméronasal. Cet organe en effet, principal responsable de la transduction de l'information phéromonale, est encapsulé et l'accès des molécules dépend de l'activation d'une pompe sous le contrôle du système nerveux autonome.

Le premier chapitre (**Chapitre I**) de cette thèse est consacré aux différents aspects théoriques ainsi qu'aux travaux publiés relatifs à notre problématique de recherche. Dans une première partie (**Partie 1**), l'ensemble du système olfactif principal est décrit, incluant ses particularités anatomiques ainsi que son fonctionnement, du niveau périphérique à l'intégration du message olfactif à des niveaux centraux. Le système olfactif accessoire ou système voméronasal, est ensuite présenté (**Partie 2**). De la même façon que pour le système olfactif principal, sa structure et ses fonctions sont exposées. Une troisième partie

**(Partie 3)** est consacrée au système trigéminal qui fait partie du système somesthésique. Ce système ne fait pas l'objet d'études dans cette thèse, mais comme la plupart des substances volatiles toxiques activent conjointement le système olfactif principal et le système trigéminal et qu'il participe à la détection des odeurs utilisées lors des tests comportementaux, son fonctionnement sera brièvement exposé. Dans une quatrième partie **(Partie 4)** sont énoncés les différents mécanismes de protection des voies respiratoires, avec la description de multiples enzymes de biotransformation situées dans la muqueuse nasale ainsi que leurs rôles dans la détoxification d'agents xénobiotiques inhalés. Enfin, une description des polluants fera l'objet d'une cinquième et dernière partie **(Partie 5)**, incluant leurs sources ainsi que les divers travaux menés chez l'animal concernant les polluants étudiés dans cette thèse.

Suite à l'exposé du cadre théorique, un second chapitre **(Chapitre II)** composé de cinq parties présente l'ensemble des travaux expérimentaux réalisés au cours de cette thèse. Une première partie **(Partie 1)** est consacrée à la description des méthodes expérimentales incluant les techniques mises en œuvre lors de l'exposition à des polluants, les tests comportementaux, les mesures histologiques et les marquages cellulaires. Les parties suivantes tentent de répondre à nos questions et nos hypothèses de travail. La seconde partie du chapitre II **(Partie 2)** porte sur l'étude des effets éventuels de l'exposition sur une courte durée à des polluants sur le système olfactif principal de la souris, d'un point de vue comportemental et histologique. Une troisième partie **(Partie 3)** présentent les résultats des tests fonctionnels et des observations histologiques obtenus montrant l'influence de la durée et de la concentration en polluant sur l'épithélium olfactif principal de la souris. Dans une quatrième partie **(Partie 4)** sont exposés les résultats de marquages immunohistochimiques au niveau de l'épithélium du système olfactif principal. Une cinquième partie **(Partie 5)** montrent les effets au niveau tissulaire de l'exposition à des polluants sur l'épithélium de l'organe voméronasal. Enfin, une discussion générale **(Chapitre III)** dresse le bilan des résultats obtenus lors des différentes études présentées dans cette thèse, par une confrontation à la littérature d'un point de vue des données mesurées mais également de la méthodologie. D'autres perspectives de recherche liées à nos travaux sont exposées en fin de discussion, conduisant par exemple à l'étude des effets de l'inhalation de substances volatiles toxiques sur les systèmes olfactifs à des niveaux supérieurs, tels que les bulbes olfactifs ou des centres cérébraux impliqués dans l'intégration du message olfactif.

# **Chapitre I : Données bibliographiques**

## **Partie 1 : Le système olfactif principal**

L'olfaction constitue l'un des sens les plus archaïques, et malgré son importance adaptative, son étude a été longtemps négligée, comparativement à d'autres sens comme la vue ou l'ouïe. Depuis les années 1980, les travaux sur l'olfaction connaissent un nouvel essor qui aboutit en 2004 au prix Nobel de médecine et de physiologie, attribué à Linda Buck et Richard Axel pour la découverte, chez le rat, de la famille de gènes codant pour les récepteurs olfactifs. L'identification de ces gènes a ouvert une voie majeure dans la compréhension du fonctionnement du système olfactif des mammifères, notamment au niveau des récepteurs. Ce premier chapitre décrit les différentes parties du système olfactif principal, de la périphérie aux structures centrales, d'un point de vue anatomique et fonctionnel chez les rongeurs.

### **I- Nature des stimuli olfactifs**

Le système olfactif des rongeurs possède une très forte capacité de discrimination et de reconnaissance d'un grand nombre de molécules odorantes de structures différentes. Cependant, l'information contenue dans les signaux olfactifs n'est généralement pas formée d'un seul type de molécule mais d'un mélange complexe de différentes molécules odorantes. En effet, si expérimentalement un seul composé chimique peut entraîner des réponses physiologiques et comportementales, dans le milieu naturel ces réponses proviennent la plupart du temps d'une activation par des stimulations de mélanges complexes de molécules odorantes (Ache et Young, 2005).

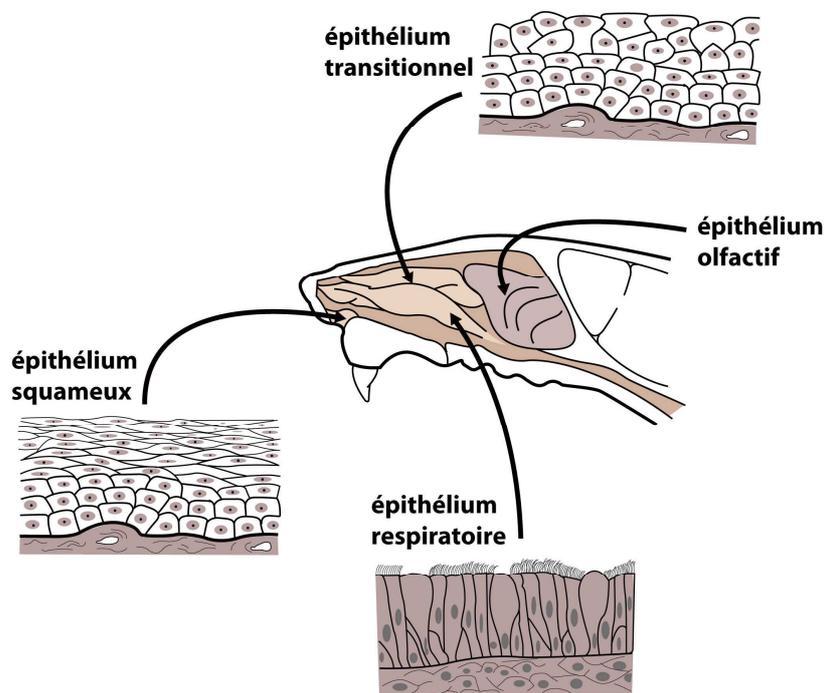
Les molécules odorantes doivent présenter plusieurs propriétés afin d'être détectées par le système olfactif. Tout d'abord, elles doivent être volatiles afin de pouvoir atteindre l'épithélium olfactif situé dans la cavité nasale. Ensuite, elles doivent être à la fois hydrosolubles pour se dissoudre dans le mucus et parvenir jusqu'aux récepteurs olfactifs, et liposolubles puisque l'extrémité apicale et les cils olfactifs des neurones récepteurs sont constitués de matériel lipidique. Cependant, le système olfactif principal peut être, comme le système voméronasal, impliqué dans la reconnaissance de molécules de communication pouvant être volatiles ou non volatiles nommées phéromones (Spehr *et al.*, 2006). Les molécules odorantes, typiquement des petites molécules organiques d'un poids inférieur à 400 Dalton, varient en taille, forme, groupes fonctionnels et charges (Amoore et Hautala, 1983).

## II- Cavité nasale et muqueuse olfactive

L'air inspiré, avant d'atteindre la muqueuse olfactive, entre en contact avec trois types successifs d'épithéliums présents dans la cavité nasale : un épithélium squameux, un épithélium transitionnel et un épithélium respiratoire (Figure 1). L'activité métabolique, bien que différente dans ces trois épithéliums, peut modifier la composition chimique des produits inhalés.

L'épithélium squameux se situe au niveau du vestibule de la cavité nasale. L'épithélium transitionnel est un épithélium cuboïde, non cilié. L'épithélium respiratoire situé de façon caudale est formé de cellules globuleuses sécrétant du mucus et de cellules ciliées, responsables du mouvement de la couche de mucus au niveau de la cavité nasale.

La muqueuse olfactive est située dans la partie postérieure des deux fosses nasales (Figure 1). Elle est formée d'une couche de mucus recouvrant l'épithélium olfactif qui repose par l'intermédiaire de sa membrane basale sur un chorion de tissu conjonctif formant la sous-muqueuse, appelée également *lamina propria*.



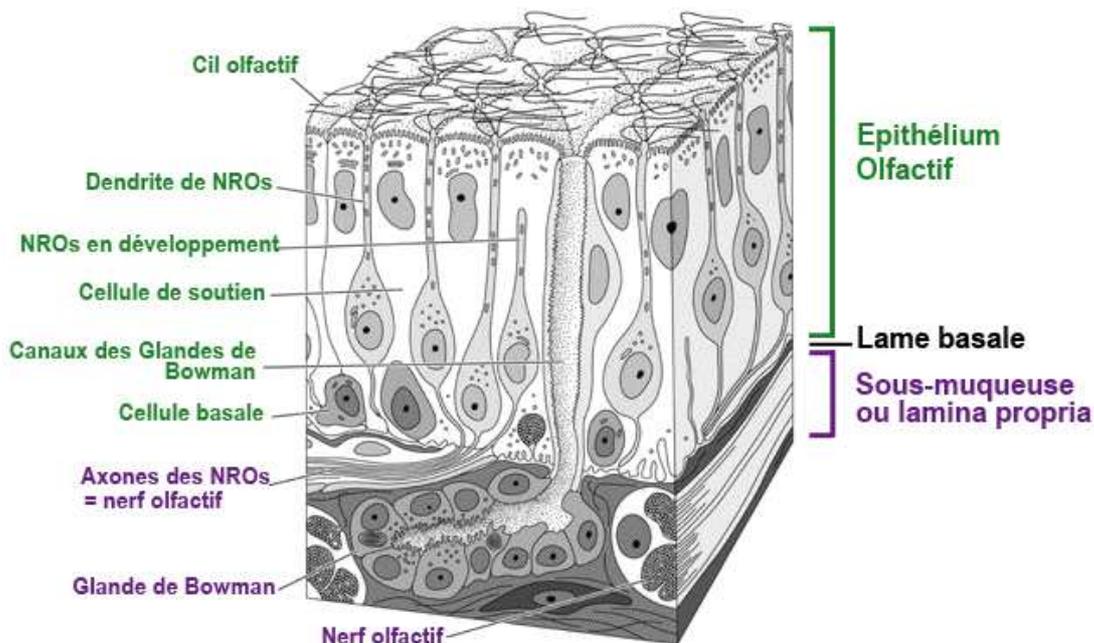
**Figure 1:** Epithéliums présents dans la cavité nasale des rongeurs (D'après Dahl et Gerde, 1994).

## 2-1- Le mucus

La surface de l'épithélium olfactif est recouverte par une couche de mucus, substance aqueuse et visqueuse sécrétée par les glandes de Bowman. Ces glandes sont situées dans la sous muqueuse et émettent des canaux sécrétoires traversant l'épithélium olfactif pour s'ouvrir à la surface du mucus. Le mucus, d'une épaisseur d'une dizaine de micromètres, est composé d'ions sodium et potassium, de protéines et de mucopolysaccharides. Les cellules de soutien participent à la régulation ionique du mucus. Ce dernier possède une fonction de protection du système olfactif puisqu'il contient des immunoglobulines qui participent à la défense contre des agents potentiellement toxiques parvenant jusque dans la cavité nasale. Outre la défense immunitaire, le mucus assure diverses fonctions, telles que la détoxification, la concentration et l'élimination des molécules odorantes.

## 2-2- L'épithélium olfactif

L'épithélium olfactif est le lieu d'interaction entre les neurones récepteurs olfactifs et les molécules odorantes. Il est le siège de la transduction olfactive. Cet épithélium neurosensoriel est prismatique et pseudo-stratifié. Il est composé de six types cellulaires principaux : les neurones récepteurs olfactifs (décrits dans le paragraphe 2-3), les cellules de soutien, les cellules basales globulaires, les cellules basales horizontales, les cellules à microvillosités et les conduits des glandes de Bowman. (Figure 2).



**Figure 2 :** Schématisation d'une coupe en trois dimensions de la muqueuse olfactive.  
NROs : Neurones Récepteurs Olfactifs (image modifiée d'après le site internet :  
biology.ucf.edu)

### Les cellules de soutien

Les cellules de soutien s'intercalent entre les neurones récepteurs olfactifs. Ce sont des cellules hautes ayant un noyau situé au pôle apical. Au niveau de ce pôle apical, les cellules de soutien sont munies de microvillosités. Ces cellules permettent la dégradation de substances organiques et d'autres molécules par la production d'enzyme tel que le cytochrome P450. Ces enzymes protègent le système nerveux central des agents toxiques inhalés en hydroxylant les composés étrangers à l'organisme. Cependant, il apparaît que certains métabolites issus de ces réactions enzymatiques sont toxiques ou carcinogènes pour l'épithélium nasal et respiratoire. Par exemple, la coumarine, le principal modèle de substrat du CYP2A5, s'est avéré toxique pour l'épithélium olfactif (Zhuo *et al.*, 1999). Les cellules de soutien participent également à la régulation des concentrations ioniques, en particulier le calcium, dont la concentration varie lors de la dépolarisation des neurones récepteurs olfactifs. Enfin, les cellules de soutien produisent des facteurs de croissance importants pour le développement des neurones olfactifs. Par exemple, elles synthétisent le neuropeptide Y dans l'épithélium olfactif postnatal et induit, par l'intermédiaire de la protéine kinase C, une prolifération des précurseurs neuronaux (Hansel *et al.*, 2001). Le neuropeptide Y est également nécessaire pour une prolifération normale des précurseurs olfactifs chez des individus adultes, et par conséquent pour maintenir les fonctions olfactives intactes en assurant un renouvellement des neurones olfactifs.

### Les cellules basales horizontales et globulaires et neurogénèse

Deux types de cellules basales sont distinguées : les cellules basales horizontales et les cellules basales globulaires. Les cellules basales horizontales sont situées près de la lame basale. Elles contiennent des kératines, des filaments intermédiaires et des tonofilaments caractéristiques des cellules épithéliales prolifératives. Les cellules basales globulaires sont arrondies, et situées entre les cellules basales horizontales et la population de neurones olfactifs immatures. Elles fournissent des populations de précurseurs ou cellules souches, qui permettent le renouvellement des neurones olfactifs qui dégèrent (Caggiano *et al.*, 1994). Les neurones olfactifs suivent un cycle de croissance, mort et régénération dont la durée varie de 6 à 8 semaines, en fonction des facteurs environnementaux qui peuvent affecter la muqueuse olfactive.

Les processus de prolifération et différenciation sont relativement peu connus, mais plusieurs éléments participant à la neurogénèse ont été identifiés. Les cellules basales globulaires donnent naissance à des progéniteurs exprimant le gène *Mash1* (pour

Mammalian Achaete Scute Homologu 1) un homologue chez les mammifères du gène proneuronal Achaete-Scute de la drosophile (Gordon *et al.*, 1995). Les cellules *Mash1*-positives donnent naissance à un deuxième type de progéniteurs, les précurseurs neuronaux immédiats, qui expriment le gène proneuronal *Ngn1* (pour Neurogenin1). Les précurseurs neuronaux immédiats vont se diviser et donner naissance à des cellules filles neuronales qui vont se différencier en neurones récepteurs olfactifs (Calof *et al.*, 2002). Plusieurs facteurs, présents dans l'environnement des cellules souches, stimulent la prolifération et/ou la survie des cellules souches et progénitrices, et régulent cette prolifération. Ces facteurs de signalisation sont par exemple la famille des facteurs de croissance fibroblastique FGF (pour Fibroblast Growth factor) qui sont d'importants facteurs progéniques; des membres de la famille des TGF- $\beta$  (Transforming Growth Factor- $\beta$ ) qui semblent promouvoir la différenciation neuronale; mais aussi des protéines de la morphogénèse osseuse ainsi que le facteur de croissance/différenciation 11 qui sont d'importants régulateurs négatifs.

#### Les cellules à microvillosités

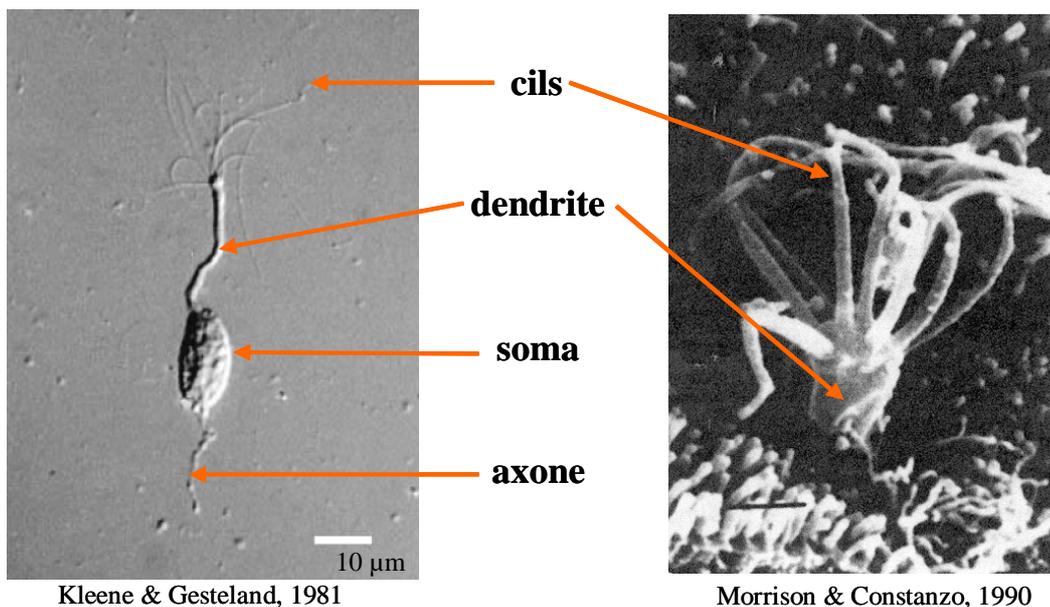
Outre les différents types cellulaires présentés ci-dessus, il existe au moins quatre autres types cellulaires moins abondants dans l'épithélium olfactif, qui sont munis de microvillosités (Carr *et al.*, 1991 ; Miller *et al.*, 1995). Ces cellules diffèrent par l'aspect de leurs microvillosités. Un premier type cellulaire est dit « en brosse », en raison de l'aspect de ses microvillosités. Un second type moins fréquent est formé de cellules dont les microvillosités ont un diamètre et une longueur plus uniformes que ceux des cellules de soutien. Un troisième type peu fréquent porte des microvillosités compactes. Un quatrième type, dont l'assemblage des microvillosités ressemble à la forme des cellules ciliées de l'oreille, n'est présent que durant la phase de développement de l'organisme. Le corps cellulaire de ces cellules est situé dans la partie superficielle de l'épithélium. Le rôle exact de ces différents types de cellules portant des microvillosités fait l'objet de controverses et reste à déterminer.

### **2-3- Les neurones récepteurs olfactifs**

Dans le système olfactif principal, au niveau périphérique, les neurones récepteurs olfactifs reçoivent l'information venant de l'environnement et la transmettent au cerveau où elle est intégrée pour fournir une représentation du monde externe. Les neurones récepteurs

olfactifs, en raison de leur situation anatomique, possèdent la particularité d'être les seuls neurones exposés directement à l'environnement extérieur.

Les neurones récepteurs olfactifs constituent le type cellulaire le plus important représenté dans l'épithélium olfactif puisque ce dernier en contient environ 5 millions chez le rongeur, représentant de 75 à 80% des cellules totales présentes dans l'épithélium olfactif (Farbman, 1992). Les neurones récepteurs olfactifs sont bipolaires (Figure 3). Le prolongement apical dirigé vers la cavité nasale se termine en un renflement munis de cils olfactifs qui baignent dans la couche de mucus. Sur les cils olfactifs se trouvent les récepteurs aux molécules odorantes (Buck et Axel, 1991). Ces récepteurs appartiennent à la famille des récepteurs couplés aux protéines G, protéines connues pour leur rôle dans la communication cellulaire. Parmi un répertoire d'environ 1300 gènes (Mombaerts, 1999; Zhang et Firestein, 2002) codant pour les récepteurs olfactifs, un neurone récepteur olfactif n'exprime qu'un seul type de récepteur (Malnic *et al.*, 1999). La spécificité de liaison pour un type de récepteur est sélective, mais non-spécifique (Raming *et al.*, 1993), ce qui veut dire que chaque récepteur olfactif peut être activé par une large variété de composés odorants.



**Figure 3:** Cils olfactifs présents sur les neurones olfactifs observés en microscopie électronique à balayage

Le second prolongement rejoint le bulbe olfactif à travers la lame criblée de l'os ethmoïde. Les axones des neurones olfactifs se regroupent alors en filets nerveux olfactifs qui constituent les nerfs olfactifs (première paire de nerfs crâniens).

Les neurones récepteurs olfactifs exprimant un récepteur donné sont restreints à une zone de l'épithélium olfactif. En effet, des études menées chez les rongeurs ont mis en évidence une ségrégation spatiale de l'expression des récepteurs des neurones récepteurs olfactifs (Ressler *et al.*, 1993 ; Vassar *et al.*, 1993). Quatre zones distinctes de l'épithélium olfactif ont été ainsi identifiées dont l'organisation se fait selon les axes dorso-ventral et médian-latéral (zones dorso-latérale, dorso-médiane, ventro-médiane, ventro-latérale). Dans chaque zone, les neurones récepteurs olfactifs exprimant le même type de récepteur olfactif sont distribués aléatoirement, si bien que l'épithélium olfactif est organisé comme une mosaïque de cellules exprimant différents récepteurs. Cette ségrégation observée au niveau de l'épithélium olfactif est maintenue lors des projections au bulbe olfactif (Schoenfeld *et al.*, 1994; Saucier et Astic, 1986). Par exemple, les neurones récepteurs olfactifs localisés de façon ventrolatérale dans l'épithélium olfactif vont converger au niveau du bulbe olfactif dans des glomérules ventrolatéraux. (Ressler *et al.*, 1993 ; Vassar *et al.*, 1993).

Une classe distincte de récepteurs chimiosensoriels a été récemment découverte (Liberles et Buck, 2006). Ces récepteurs sont appelés TAARs (Trace Amine-Associated Receptors) et sont présents chez l'Homme, la souris et le poisson. Ils sont de trois types qui reconnaissent des amines volatiles trouvés dans l'urine. Un de ces récepteurs détecte des molécules liées au stress ( $\beta$ -phenylethylamine), tandis que les deux autres sont sensibles à des composés présents dans l'urine (isoamylamine et triméthylamine), en particulier dans l'urine de souris mâle. Un de ces composés, l'isoamylamine, est considéré comme une phéromone qui accélère la puberté chez les souris femelles (Nishimura *et al.*, 1989). Les récepteurs TAARs détectent donc des indices sociaux qui peuvent entraîner des comportements innés et des réponses physiologiques. Les réponses induites par la perception des phéromones ne sont donc pas le résultat de l'activation seule du système voméronasal, mais sont également dues à l'activation du système olfactif principal (Restrepo *et al.*, 2004; Boehm *et al.*, 2005).

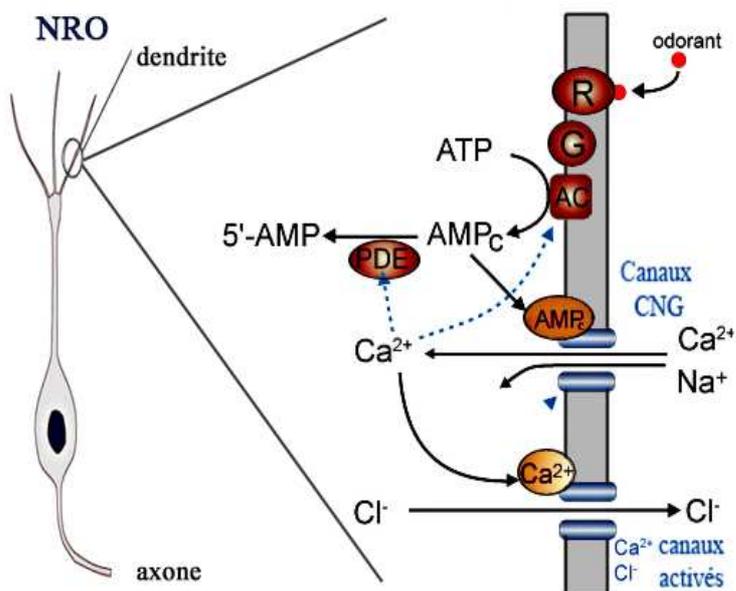
#### **2-4- La sous-muqueuse**

La sous muqueuse est un chorion formé de tissu conjonctif. Elle contient en particulier les filets nerveux amyéliniques formés par les axones des neurones olfactifs, de nombreux vaisseaux sanguins et de volumineuses glandes exocrines.

### III- Transduction du signal olfactif

Le début de la transduction du signal olfactif a lieu au niveau des cils olfactifs, lorsqu'une molécule odorante se lie à un récepteur présent sur ces cils (Figure 4). La liaison de la molécule odorante avec le récepteur se fait soit de façon directe, soit par l'intermédiaire d'une protéine spécifique : la protéine olfactive de liaison (OBP pour Olfactory Binding Protein dans la littérature anglosaxonne). Cette protéine globulaire appartenant à la famille des lipocalines, est présente dans le mucus et aurait pour rôle de fixer la molécule odorante hydrophobe puis de l'amener jusqu'aux récepteurs olfactifs (Pelosi, 1994; Steinbrecht, 1996; Hajjar *et al.*, 2006).

La fixation sur le récepteur a pour conséquence l'activation d'une protéine impliquée uniquement dans les mécanismes de transduction du signal olfactif, la protéine  $G_{olf}$  (Jones et Reed, 1989). Cette protéine  $G_{olf}$  active une adénylate cyclase III qui catalyse la production du second messenger adénosine monophosphate cyclique (Gold et Nakamura, 1987). Il résulte de cette activation une ouverture des canaux ioniques qui provoque une entrée de calcium et de sodium, ayant pour conséquence une dépolarisation de la membrane du neurone récepteur olfactif (Firestein *et al.*, 1991). Cette dépolarisation, qui débute donc au niveau des cils olfactifs, est potentialisée par un courant chlore qui fait suite à l'ouverture des canaux chlorure calcium-dépendants activés par le calcium intracellulaire. Ce courant de transduction va se propager le long de la dendrite vers le corps cellulaire, pour atteindre la zone gâchette, endroit où va prendre naissance le potentiel d'action qui va longer l'axone et se diriger vers le bulbe olfactif.



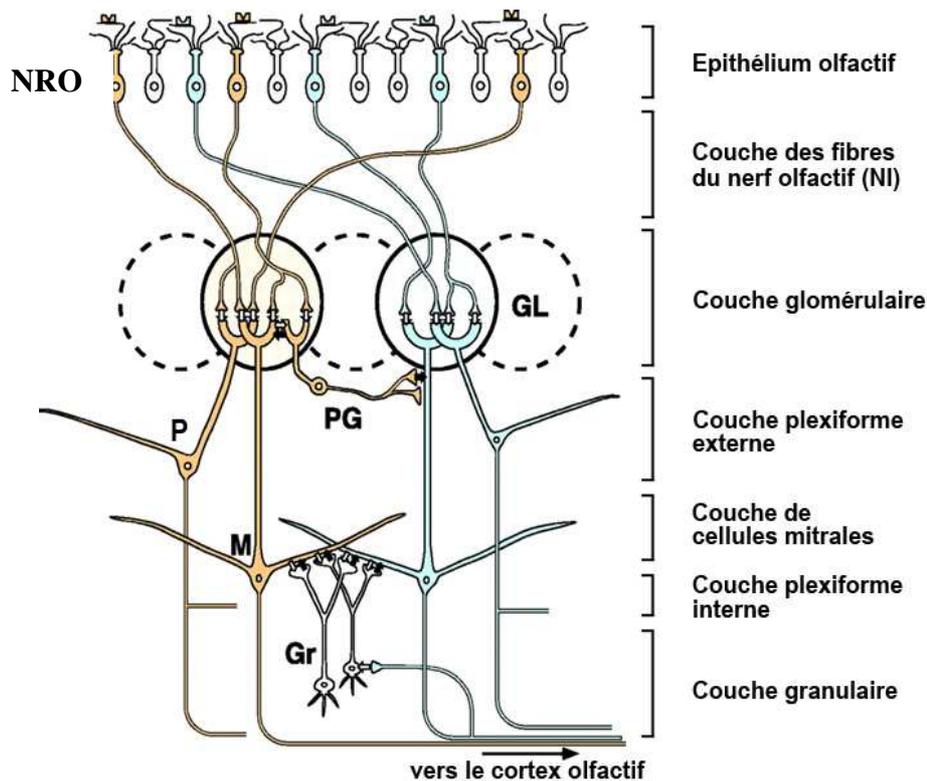
**Figure 4 :** Voie de transduction olfactive mettant en jeu l'AMPc

**R :** Récepteur ; **G :** Protéine G ; **AC :** Adénylate Cyclase ; **Cl<sup>-</sup> :** Chlore ; **Ca<sup>2+</sup> :** Calcium ; **Na<sup>+</sup> :** Sodium ; **NRO :** Neurone Récepteur Olfactif ; **AMPc :** Adénosine MonoPhosphate cyclique ; **ATP :** Adénosine TriPhosphate ; **Canaux CNG :** Cyclic Nucleotid Gated, ce sont des canaux ioniques sensibles aux nucléotides cycliques ; **PDE :** PhosphoDiEstérase. (D'après Wong *et al.*, 2000)

Une seconde voie de transduction du message olfactif est également décrite. Elle impliquerait comme second messager l'inositol triphosphate. La liaison odorant-récepteur activerait la phospholipase C, entraînant ainsi une augmentation d'inositol triphosphate et une ouverture des canaux calciques. L'augmentation de calcium intracellulaire provoquerait une dépolarisation puis la création au niveau des corps cellulaires des neurones récepteurs olfactifs d'un potentiel d'action qui se propagerait le long des axones jusqu'au bulbe olfactif. Pour de nombreux chercheurs, l'adénosine monophosphate cyclique est le seul second messager indispensable dans les processus de transduction olfactive (Barry, 2003 ; Takeuchi *et al.*, 2003). Cependant, des travaux récents ont révélés l'existence conjointe des deux voies de transduction, par l'adénosine monophosphate cyclique et l'inositol triphosphate, lors de la stimulation d'une neurone récepteur olfactif par de forte concentration en molécule odorante n'activant à de faible concentration que la voie de l'adénosine monophosphate cyclique (Ko et Park, 2006).

#### **IV- Les bulbes olfactifs**

A la sortie de l'épithélium olfactif, les axones des neurones récepteurs olfactifs se réunissent en faisceaux et forment alors le nerf olfactif (nerf I). Les nerfs olfactifs droit et gauche projettent dans les bulbes olfactifs de façon ipsilatérale. Les récepteurs olfactifs partageant une homologie dans leur séquence se lient avec des molécules odorantes de structures similaires (Malnic *et al.*, 1999), et les neurones récepteurs olfactifs exprimant ces récepteurs projettent sur des glomérules voisins (Tsuboi, 1999; Johnson et Leon, 2000 ; Uchida *et al.*, 2000). Les bulbes olfactifs sont de forme allongée et ovale et sont couchés sur la lame criblée de l'os ethmoïde. Un bulbe olfactif est une structure organisée en couches concentriques de cellules: couches du nerf olfactif, couche glomérulaire, couche plexiforme externe, couche de cellules mitrales, couche plexiforme interne et couche granulaire (Figure 5). Il est caractérisé principalement par des amas sphériques de neuropiles situés juste sous la surface du bulbe nommés glomérules, qui reçoivent les informations olfactives primaires. Au niveau de ces structures, des synapses se forment entre les axones des neurones récepteurs olfactifs et les cellules à panaches ainsi que les cellules mitrales. Ces deux types cellulaires constituent les cellules relais du bulbe olfactif.

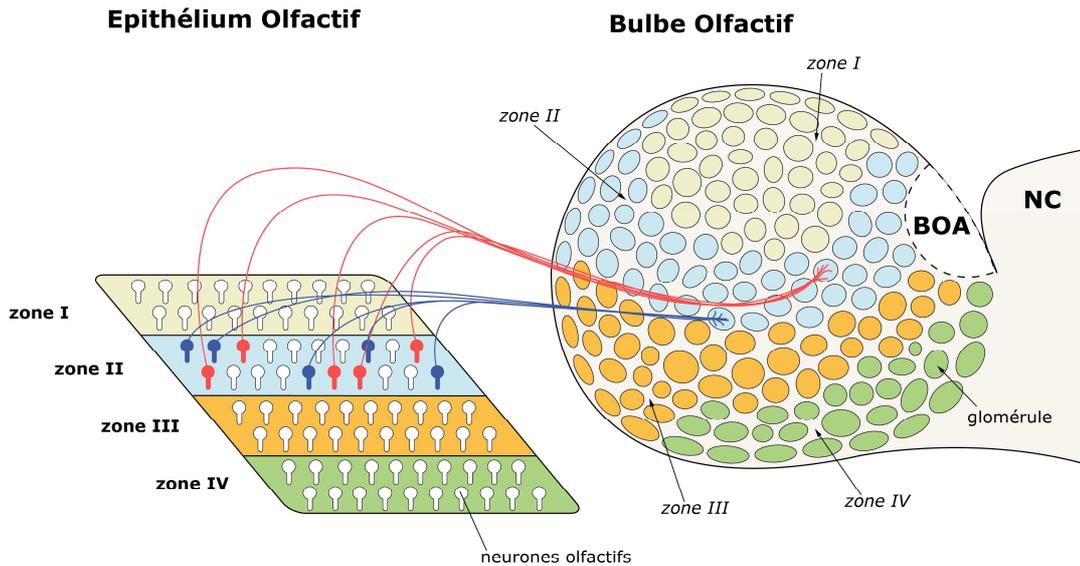


**Figure 5 :** Organisation cellulaire du bulbe olfactif (D'après Mori *et al.*, 1999).

**NRO :** Neurone Récepteur Olfactif **GL :** glomérules ; **PG :** interneurons périglomérulaires ; **P :** cellules à panaches ; **M :** cellules mitrales ; **Gr :** cellules granulaires.

Les projections axonales olfactives sur le bulbe olfactif suivent deux principes de base : les projections zone à zone, et la convergence glomérulaire. En effet, l'information issue des neurones récepteurs olfactifs dans une zone donnée de l'épithélium olfactif est transmise à des glomérules puis aux cellules mitrales dans la zone correspondante du bulbe olfactif (Figure 6). De plus, un phénomène de convergence est observé au niveau du bulbe olfactif, et en particulier des glomérules (Strotmann *et al.*, 2000). Chez la souris, chaque glomérule reçoit des axones d'environ 25000 neurones récepteurs olfactifs qui font synapse avec les dendrites apicales d'environ 25 cellules mitrales. Cette convergence a pour conséquence principale l'augmentation de la puissance du signal (Duchamp-Viret *et al.*, 1989).

Le bulbe olfactif est également caractérisé par un circuit d'interneurones inhibiteurs GABAergiques constitué par les cellules périglomérulaires et les cellules granulaires. Ces interneurons, créant des inhibitions et des boucles de rétroaction, synchronisent l'activité électrique des cellules mitrales.

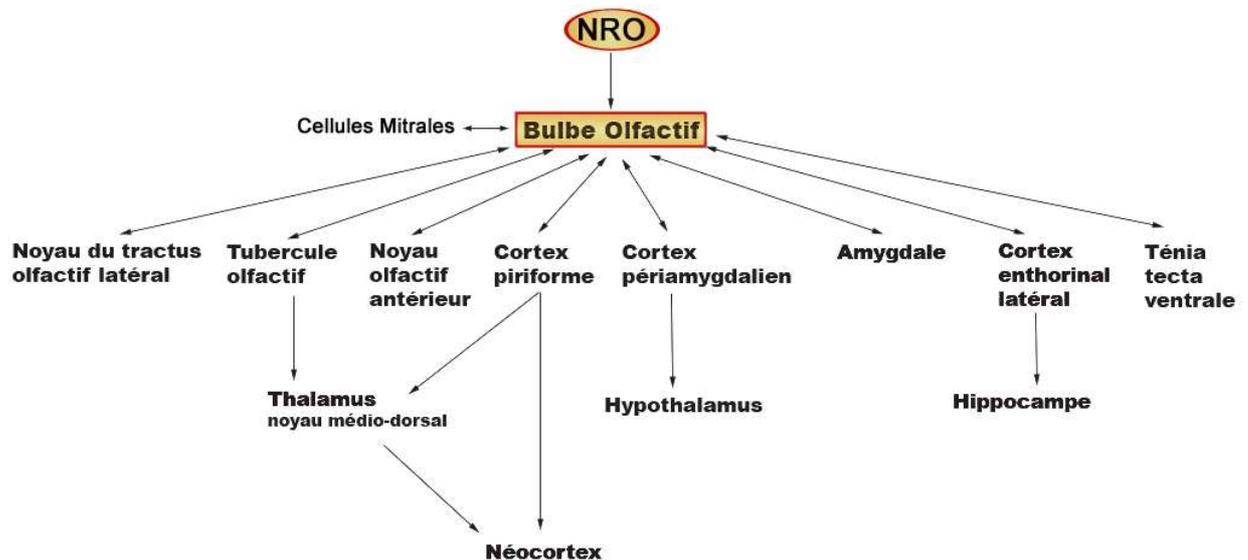


**Figure 6 :** Organisation du bulbe olfactif. Projections zone à zone (D'après Mori *et al.*, 1999).  
BOA : Bulbe Olfactif Accessoire ; NC : NéoCortex

## V- Les voies centrales olfactives

A la sortie du bulbe olfactif, un groupe de cellules à panache projettent sur le noyau olfactif antérieur alors que la plupart des cellules relais forme un faisceau d'axones appelé tractus olfactif latéral qui se projette sur plusieurs structures (Figure 7). Ces structures, regroupées sous l'appellation "cortex olfactif primaire" sont constituées par le cortex piriforme, le tubercule olfactif, le cortex entorhinal, le cortex périamygdalien et le noyau olfactif antérieur. Ces aires corticales sont largement interconnectées à l'exception du tubercule olfactif qui reçoit mais n'envoie pas de connexion en retour. Des neurones acheminent ensuite les informations olfactives à des structures sous-corticales et corticales, telles que l'hippocampe (depuis le cortex entorhinal), l'hypothalamus (depuis le cortex périamygdalien), le thalamus (depuis le tubercule olfactif et le cortex piriforme) et le cortex orbito-frontal. Il existe donc deux voies de transmission du signal olfactif. Une première voie nerveuse se dirige, directement ou par un relai au niveau du thalamus, vers le cortex orbito-frontal. Cette projection dans le néocortex est impliquée dans la perception et la discrimination olfactive (Savic *et al.*, 2000). Une deuxième voie nerveuse projette

dans le système limbique (Savic, 2001). Cette dernière se divise pour rejoindre, d'une part le cortex enthorinal et l'hippocampe où elle intervient dans les processus mnésiques, et d'autre part vers l'hypothalamus et le tegmentum du mésencéphale via l'amygdale (Zald et Pardo, 1997).



**Figure 7 :** Organisation du système olfactif : le message olfactif est initié par les neurones récepteurs olfactifs (NROs), modulé au niveau du bulbe olfactif par les cellules mitrales, puis transmis depuis le bulbe olfactif vers différentes régions corticales par des voies centrifuges (D'après Brand, 2001).

## VI- Conclusion

Les mécanismes de traitement de l'information olfactive débutent lors de la liaison d'une molécule odorante avec un récepteur olfactif exprimé par un neurone récepteur olfactif. Les neurones récepteurs olfactifs sont situés dans la partie postérieure de la cavité nasale, au niveau de l'épithélium olfactif. Les récepteurs olfactifs appartiennent à la superfamille des récepteurs couplés à des protéines G possédant sept domaines transmembranaires. La transduction du signal olfactif emprunte principalement la voie de l'adénosine monophosphate cyclique aboutissant à une dépolarisation de la membrane du neurone récepteur olfactif et une augmentation de la fréquence des potentiels d'action. Le message olfactif se dirige ensuite au niveau du bulbe olfactif, dans des structures nommées glomérules. Du bulbe olfactif, les informations sont transmises au cortex olfactif primaire, puis sur diverses structures telles que l'hypothalamus ou le néocortex, permettant ainsi la perception des odeurs.

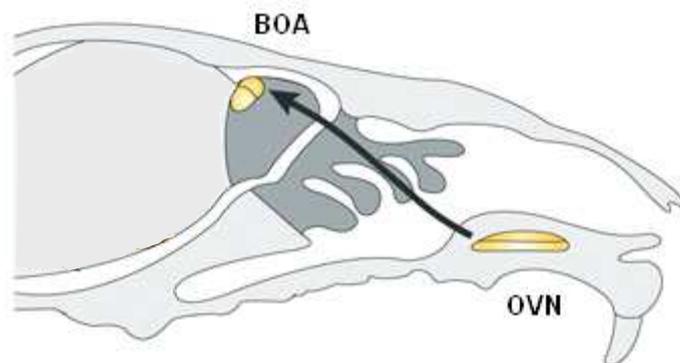
## Partie 2 : Le système olfactif accessoire

### I- Généralités

Le système voméronasal, incluant l'organe voméronasal, le bulbe olfactif accessoire, et des centres supérieurs a pour rôle principal la détection de substances associées à des comportements sociaux et reproductifs. L'organe voméronasal a été décrit chez les mammifères pour la première fois en 1813 par l'anatomiste Danois Ludvig Jacobson (1783-1843) qui lui donna son nom (Jacobson, 1813 ; Jacobson *et al.*, 1998 pour la traduction de l'article original). Jacobson supposait que cet organe avait une fonction sécrétoire mais pensait qu'il pouvait s'agir également d'un organe sensoriel. Actuellement, l'organe voméronasal des mammifères est considéré comme un organe chimiosensoriel capable de détecter des molécules volatiles et non volatiles dont la perception entraînerait des comportements spécifiques intervenant dans l'agression entre individus mâles, la reproduction ou encore le marquage du territoire. Il existe des différences d'occurrence et d'élaboration du système voméronasal qui dépendent de l'écologie comportementale de l'espèce considérée (Dawley, 1998). C'est un système généralement présent dans la cavité nasale de la plupart des amphibiens, des reptiles et des mammifères non-primates, mais absent chez les oiseaux, les singes adultes catarrhiniens et les gorilles. Les parties suivantes ne traiteront que du système voméronasal des rongeurs.

### II- Localisation et structure de l'organe voméronasal

Le système olfactif accessoire est constitué de l'organe voméronasal, qui est relié au bulbe olfactif accessoire situé de façon dorso-postérieure par rapport au bulbe olfactif (Figure 8).

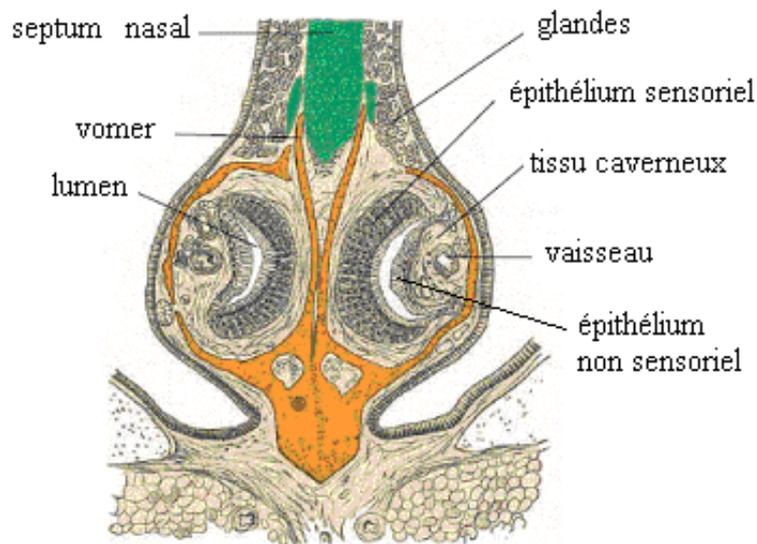


**Figure 8:** Localisation du système voméronasal chez le rongeur.  
OVN : organe voméronasal ; BOA : bulbe olfactif accessoire  
(D'après Dulac et Torello, 2003).

Les informations sont ensuite acheminées vers diverses structures cérébrales. L'organe voméronasal est un organe chimiosensoriel distinct, séparé de la cavité nasale, situé à la

base de celle-ci, de part et d'autre du septum nasal (Figure 9). C'est une structure tubulaire, dont la section sagittale est en forme de croissant. Cet organe est logé dans une capsule cartilagineuse qui s'ouvre à la base de la cavité nasale.

L'organe voméronasal dérive embryologiquement de la placode olfactive. Il devient morphologiquement reconnaissable chez des embryons de souris à partir du 11<sup>e</sup> jour (Cappello *et al*, 1999). Aux environs du 13<sup>e</sup> jour, l'épithélium suivant le lumen se différencie en un épithélium médian et un épithélium latéral fin, usuellement nommés épithélium sensoriel et épithélium non sensoriel. A l'âge adulte, l'organe voméronasal constitue une structure bien compartimentée comprenant d'une part l'épithélium sensoriel de l'organe voméronasal qui contient des cellules de soutien et des neurones chimiosensoriels à des degrés variables de différenciation, et d'autre part l'épithélium non sensoriel qui n'est pourvu d'aucune cellule neuronale.



**Figure 9:** Coupe coronale de la région ventrale du septum nasal de la souris. (Døving et Trotier, 1999, d'après von Mihalkovics, 1899).

L'épithélium de l'organe voméronasal est un épithélium pseudostratifié contenant trois types cellulaires : les cellules réceptrices neurosensorielles, les cellules de soutien et les cellules basales. Les neurones récepteurs, divisés en deux catégories, les récepteurs voméronasaux 1 et les récepteurs voméronasaux 2, forment deux populations distinctes (voir partie IV). Les cellules de soutien sont situées dans la couche superficielle de l'épithélium sensoriel, tandis que les cellules basales sont localisées au niveau de la lame

basale, ainsi qu'aux extrémités de l'épithélium sensoriel, à la limite entre celui-ci et l'épithélium non sensoriel (Barber et Raisman, 1978).

### **III- Accès des stimuli à l'organe voméronasal**

Dans la plupart des réponses hormonales et comportementales impliquant le système olfactif accessoire, la nature chimique du stimulus n'est pas encore totalement élucidée. Il apparaît cependant qu'un contact physique avec les stimuli soit nécessaire pour entraîner une réponse due à la détection de phéromones. L'organe voméronasal pourrait réagir à des stimuli volatiles ou non-volatiles. Les stimuli volatiles seraient de petites tailles, et pourraient être transportés jusqu'à l'organe voméronasal en association avec des protéines de liaison telle la voméroduline produite par les glandes voméronasales (Miyawaki *et al.*, 1994). Ces protéines de liaison sont retrouvées en forte concentration dans l'urine de souris mâle et il a été montré qu'elles avaient une activité phéromonale. C'est le cas par exemple de la brévicomine ou du thiazole. L'urine de souris mâle contient également des protéines urinaires majeures. Les protéines urinaires majeures sont des protéines appartenant à la famille des lipocalines, une superfamille de protéines connues pour lier et transporter des ligands hydrophobes. Dans l'urine de souris mâle, la brévicomine et le thiazole sont fortement liés aux protéines urinaires majeures (Bacchini *et al.*, 1991). Le rôle de ces protéines n'est pas encore totalement élucidé. Elles pourraient agir comme des réservoirs de ligands volatiles, permettant leur largage sur de longues périodes depuis le dépôt d'urine. Cette hypothèse est cohérente avec les résultats montrant que l'activité phéromonale est généralement associée avec la fraction protéinaire de l'urine de souris (Vanderbergh *et al.*, 1975 ; Marchlewska-Koj, 1981).

Comme l'organe voméronasal a pour seul accès une ouverture à la base de la cavité nasale, les récepteurs de cet organe sont isolés du flux nasal qui portent les molécules odorantes volatiles jusqu'à l'épithélium olfactif. Par conséquent, l'accès des stimuli à l'organe voméronasal dépend entièrement d'un mécanisme de pompe, qui est sous le contrôle du système nerveux autonome. Ce mécanisme de pompe agit par activation du système sympathique et entraîne une constriction des vaisseaux dans l'organe voméronasal, conduisant à un flux de mucus dans l'organe voméronasal (Meredith et O'Connell, 1979). Cette pompe n'est pas activée continuellement ou suivant le cycle respiratoire, mais son activation apparaît dans des situations associées à la nouveauté et l'exploration de l'environnement (Meredith, 1994).

Des comportements spécifiques sont souvent observés en association avec l'investigation de stimuli voméronasaux et leur accès à l'organe voméronasal. En effet, chez la plupart des mammifères, et en particulier chez les rongeurs, le léchage et la respiration de marques urinaires permettent l'introduction de composés protéinés dans la cavité nasale permettant ainsi leur accès à l'organe voméronasal.

#### **IV- Les récepteurs de l'organe voméronasal**

Chez les rongeurs, les récepteurs de l'organe voméronasal sont des neurones bipolaires, dont la dendrite qui atteint la surface de l'épithélium est munie de microvillosités. Comme les neurones olfactifs, les neurones de l'organe voméronasal sont doués d'une capacité de régénération. Il est estimé que le temps de survie d'une cellule neurosensorielle de l'organe voméronasal est de 2 à 3 mois (Wilson et Raisman, 1980 ; Yoshida-Matsuoka *et al.*, 2000 ; Matsuoka *et al.*, 2000) et qu'il existe deux pôles de cellules germinatives, localisés à chaque extrémité et au niveau de la couche basale de l'épithélium de l'organe voméronasal (Giacobini *et al.*, 2000).

Deux familles multigéniques de récepteurs couplés à des protéines G, les récepteurs voméronasaux 1 et les récepteurs voméronasaux 2, ont été identifiées (Dulac et Axel, 1995 ; Herrada et Dulac, 1997 ; Ryba et Tirindelli, 1997 ; Matsunami et Buck, 1997).

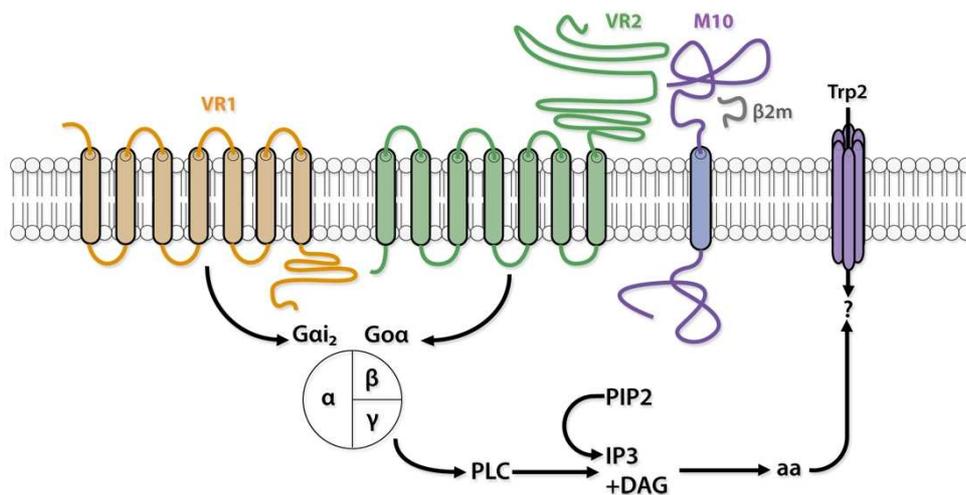
Ces récepteurs partagent une faible homologie avec ceux présents dans l'épithélium olfactif et il existe une faible homologie entre les deux classes de récepteurs. Ces récepteurs comportent sept domaines trans-membranaires qui diffèrent d'une part par leur liaison à différentes protéines G (Jia et Halpern, 1996), et d'autre part par la longueur de leur domaine NH<sub>2</sub>-terminal extracellulaire. Chaque type est localisé dans une région distincte de l'organe voméronasal. Les récepteurs voméronasaux 1, localisés dans la zone apicale de l'épithélium neurosensoriel de l'organe voméronasal proche du lumen, sont couplés à une protéine G $\alpha$ <sub>i2</sub>, et possèdent un domaine NH<sub>2</sub>-terminal relativement court. De plus, il existe une forte diversité de séquence dans leur domaine trans-membranaire (Tirindelli *et al.*, 1998). Les V1Rs comprennent une famille d'environ 150 gènes fonctionnels (Rodriguez, 2004 ; Rodriguez *et al.*, 2002). Les récepteurs voméronasaux 2 sont quant à eux couplés à une protéine G $\alpha$ <sub>o</sub>, et sont situés dans la région basale de l'épithélium sensoriel de l'organe voméronasal. Ils comprennent une famille d'environ 60 gènes fonctionnels (Yang *et al.*, 2005) et se distinguent par leur long domaine extracellulaire NH<sub>2</sub>-terminal qui est supposé se lier avec des molécules. Il existe des

homologies entre les séquences des récepteurs voméronasaux 2 et les récepteurs au glutamate qui possèdent également un large domaine extracellulaire NH<sub>2</sub>-terminal, et qui ont une faible adaptation. Comme la structure de ces deux types de récepteurs est différente, on peut supposer qu'ils répondent à différents types de signaux chimiques. Les petites molécules organiques se lient préférentiellement sur le site transmembranaire de liaison des récepteurs voméronasaux 1 (Del Punta *et al.*, 2002, Leinders-Zufall *et al.*, 2000), tandis que les peptides interagissent avec le long domaine extracellulaire des VR2s (Kimoto *et al.*, 2005 ; Leinders-Zufall *et al.*, 2004).

Les seuils de détection pour certaines molécules à activité phéromonale, mesurés par des techniques d'électrophysiologie et d'imagerie confocale avec enregistrement du calcium intracellulaire, sont remarquablement faibles, de l'ordre de 10<sup>-10</sup> à 10<sup>-11</sup> moles, plaçant les neurones de l'organe voméronasal parmi les plus sensibles chimiodétecteurs chez les mammifères (Leinders-Zufall *et al.*, 2000).

## **V- Mécanismes de transduction des signaux**

La transduction du signal chez les récepteurs voméronasaux 1 et les récepteurs voméronasaux 2 est réalisée par la voie de la phospholipase C (Figure 10). Via différentes protéines G hétérotrimériques exprimées par les récepteurs voméronasaux, des ligands activent la phospholipase C, aboutissant à la production d'un second messenger, l'inositol-tri-phosphate (Weseka et Anholt, 1997). Il résulte également de cette activation une production de diacylglycérol, qui va générer par la suite de l'acide arachidonique. Ces processus vont aboutir à l'ouverture des canaux TRPC2 localisés dans les microvillosités des neurones sensoriels, ce qui aura pour conséquence une modification du potentiel de membrane (Liam et Corey, 1996). Le fonctionnement des canaux TRPC2 est la voie principale de transduction qui entraîne une réaction en chaîne de seconds messagers suite à la stimulation de l'organe voméronasal par des phéromones (Lucas *et al.*, 2003).



**Figure 10 :** Mécanismes de transduction du signal dans le système voméronasal (D'après Dulac et Torello, 2003)

**VR1/VR2 :** récepteurs voméronasaux de type 1 et 2 ; **Gai2/Gao :** protéines G (avec trois sous-unités : **α**, **β** et **γ**) couplées aux récepteurs voméronasaux ; **PLC :** PhosphoLipase C ; **IP3 :** Inositol TriPhosphate ; **PIP2 :** Phosphatidyl-Inositol-diPhosphate; **DAG :** DiAcylGlycérol; **aa :** acide arachidonique ; **β2m :** microglobuline β2 ; **Trp2 :** canal cationique.

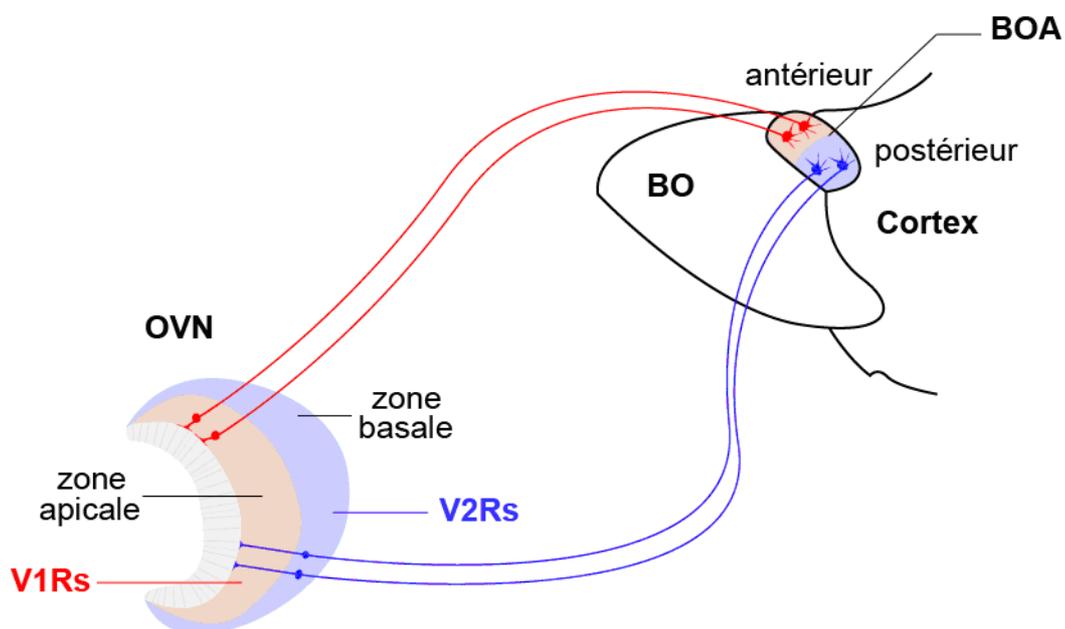
Des travaux conduits par Loconto *et al.* (2003) ont permis d'acquérir de nouvelles connaissances dans la compréhension de la détection des phéromones. Ces chercheurs ont montré l'existence de la famille M10 appartenant au complexe majeur d'histocompatibilité non classique et des microglobulines β2. Ces éléments sont fonctionnellement associés aux récepteurs voméronasaux 2 et participeraient alors à la détection des phéromones. En effet, l'association moléculaire entre les M10 et les récepteurs voméronasaux 2 à la surface des dendrites de l'organe voméronasal pourrait altérer le mécanisme et la spécificité de la reconnaissance phéromonale, ajoutant ainsi un degré supplémentaire de complexité dans le processus de détection des phéromones.

## VI- Le bulbe olfactif accessoire

Chaque neurone sensoriel de l'organe voméronasal projette un axone dans le bulbe olfactif accessoire, une structure spécialisée située de façon dorsocaudale par rapport au bulbe olfactif principal (Halpern et Martinez-Marcos, 2003). Le nerf voméronasal rejoint le bulbe olfactif accessoire en passant par la lame criblée de l'os ethmoïde. Les neurones qui expriment la sous protéine  $G_{i\alpha 2}$  (soit les récepteurs voméronasaux 1) projettent dans la partie antérieure du bulbe olfactif accessoire, alors que les neurones exprimant la sous protéine  $G_{o\alpha}$  (soit les récepteurs voméronasaux 2) projettent dans la partie postérieure du

bulbe olfactif accessoire (Jia et Halpern, 1996), maintenant la ségrégation spatiale observée au niveau de l'organe voméronasal (Figure 11). En raison de cette ségrégation, plusieurs études portant sur les aspects biochimiques de l'activation de l'organe voméronasal ou l'activation neuronale du bulbe olfactif accessoire suggèrent que les récepteurs voméronasaux 1 et les récepteurs voméronasaux 2 pourraient reconnaître différents types de stimuli et par conséquent entraîner des comportements différents.

Les axones des neurones de l'organe voméronasal exprimant le même récepteur convergent vers un faible nombre de glomérules (6 à 30) du bulbe olfactif accessoire (Del Punta *et al.*, 2002). Les cellules mitrales du bulbe olfactif accessoire peuvent avoir d'une à six dendrites connectées à plusieurs glomérules.



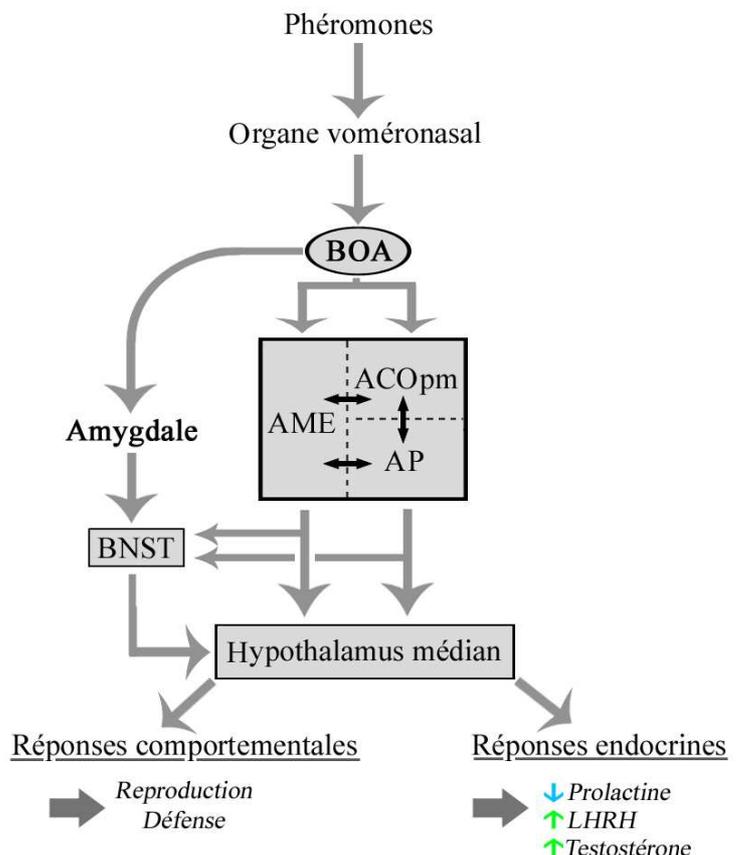
**Figure 11:** Projection des VR1s et des VR2s respectivement dans le bulbe olfactif accessoire antérieur et postérieur. (OVN : organe voméronasal ; BOA : bulbe olfactif accessoire ; BO : bulbe olfactif principal). (D'après Mombaerts, 2004).

## VII- Projections centrales

Les cellules mitrales du bulbe olfactif accessoire projettent dans le noyau de l'amygdale médiane, dans l'aire postéromédiane de l'amygdale corticale (ces deux structures forment l'amygdale voméronasale), et dans le lit du noyau de la strie terminale (Figure 12). Toutes ses connexions sont bidirectionnelles suggérant une boucle de feedback (Boehm, 2006). Ensuite, ces différentes aires de l'amygdale projettent au niveau de l'hypothalamus, générant alors des réponses comportementales et endocrines (Li *et al.*, 1990).

Plusieurs études suggèrent des ségrégations fonctionnelles au sein de l'amygdale voméronasale (Choi *et al.*, 2005). Les parties dorsale et ventrale du noyau de l'amygdale médiane postérieure sont respectivement activées par des stimuli de reproduction ou de défense (Swanson, 2000 ; Canteras, 2002). Les projections de ces deux noyaux de l'amygdale médiane au niveau de l'hypothalamus sont anatomiquement distinctes. La partie dorsale de l'amygdale médiane projette sur trois noyaux hypothalamiques interconnectés et impliqués dans les comportements liés à la reproduction : le noyau préoptique médian, le noyau hypothalamique ventromédian, et le noyau premmillaire ventral. En parallèle, la partie ventrale de l'amygdale médiane est activée par des stimuli de défense, comme des odeurs de prédateurs (Dielenberg *et al.*, 2001 ; McGregor *et al.*, 2004), et projette au niveau du noyau hypothalamique antérieur et au niveau de la partie dorsomédiane du noyau hypothalamique ventromédian. Les informations provenant de l'amygdale en direction de l'hypothalamus médian se font par des projections directes ou par un relais dans le lit du noyau de la strie terminale (Dong *et al.*, 2001 ; Dong et Swanson, 2004). Ce dernier reçoit des informations par innervation directe des cellules mitrales du bulbe olfactif accessoire et par un relais au niveau de l'amygdale, suggérant un rôle majeur dans l'intégration du signal voméronasal (Newman, 1999).

**Figure 12:** Transmission de l'information sensorielle dans le système voméronasal (BOA : Bulbe Olfactif Accessoire ; AME : amygdale médiane ; ACOpm : amygdale corticale postérieure médiane ; AP : amygdale postérieure ; BNST : lit du noyau de la strie terminale) (D'après Brennan, 2001).



## **VIII- Conclusion**

Durant les quinze dernières années, la connaissance du système voméronasal et de son fonctionnement a connu de fortes avancées. En parallèle du système olfactif, le système voméronasal a pour fonction la reconnaissance de stimuli chimiosensoriels de différentes classes. L'épithélium neurosensoriel de l'organe voméronasal est constitué de deux types distincts de récepteurs, les récepteurs voméronasaux 1 et les récepteurs voméronasaux 2 qui diffèrent les uns des autres. Les stimuli de l'organe voméronasal sont typiquement des protéines non-volatiles appartenant à la famille des lipocalines, nommées protéines urinaires majeures, qui se lient à des petites molécules volatiles. La liaison récepteurs-ligands active un signal de transduction agissant par l'intermédiaire de la phospholipase C, conduisant à une augmentation de l'inositol triphosphate et du calcium intracellulaire. Les récepteurs voméronasaux 1 et les récepteurs voméronasaux 2 projettent, via différentes parties du bulbe olfactif accessoire et de l'amygdale, au niveau du noyau hypothalamique médian. Les diverses aires de l'hypothalamus régulent des comportements de défense, de reproduction, ainsi que des sécrétions neuroendocrines. La détermination des relations entre les ligands et les récepteurs activés constitue un axe de recherche principal, qui permettra d'apporter des éléments fondamentaux dans la compréhension du fonctionnement du système voméronasal.

## **Partie 3 : Le système trigéminal**

Outre les systèmes olfactif et voméronasal, il existe dans la cavité nasale un troisième système chimiosensoriel, le système trigéminal. Son nom provient de son organisation anatomique puisqu'il regroupe trois branches périphériques nerveuses : les nerfs mandibulaire, ophtalmique et maxillaire. Le système trigéminal nasal fait partie du système somesthésique et participe à la perception de sensation d'irritation. Il est moins sensible que le système olfactif (Green et Lawless, 1991). De plus, la plupart des composés chimiques inhalés activent conjointement le système olfactif et le système trigéminal, et il a été montré que l'activation du système trigéminal influence la perception des odeurs et des mélanges d'odeurs (Cometto-Muñiz et Hernandez, 1990). Cette partie présente la nature des stimuli, le rôle du système trigéminal, ainsi que le traitement périphérique et central des messages véhiculés par ce système.

### **I- Nature des stimuli**

A travers différentes structures réceptrices, les nerfs afférents du système trigéminal perçoivent des sensations de toucher, de pression, de température et de nociception (Sekizawa et Tsubone, 1994). La plupart des stimuli chimiosensoriels activent conjointement le système olfactif et le système trigéminal et possèdent alors des propriétés olfactives et irritantes. Le menthol par exemple, a une odeur caractéristique et produit également une sensation de froid et de picotement. Une étude menée sur 47 molécules (Doty *et al.*, 1978) a montré que seuls la vanilline et l'acide décanoïque stimulent uniquement le système olfactif, et que, au contraire, seul le dioxyde de carbone (CO<sub>2</sub>) active de façon sélective le nerf trijumeau (Cain, 1976).

Les stimulations du système trigéminal sont détectées à des concentrations moindres, avant même que l'odeur ne soit perçue (Jacquot *et al.*, 2004). Le complexe sensitif du trijumeau intègre, dans le tronc cérébral, les informations somesthésiques (mécaniques, thermiques, proprioceptives) en provenance de la sphère orofaciale et des méninges.

### **II- Rôle du système trigéminal**

La fonction principale du système trigéminal est d'agir comme une sentinelle des voies aériennes, en stoppant l'inspiration afin d'éviter à l'organisme d'inhaler des substances

potentiellement toxiques. Lorsque le système trigéminal est activé, diverses réactions physiologiques sont observées, comme une sécrétion nasale accrue, une vasodilatation, une inhibition des mouvements ciliaires par des réflexes axonaux locaux, des éternuements, une hypertension, une inhibition de la respiration par des mécanismes de réflexes centraux (Widdicombe *et al.*, 1988). Ces réponses entraînent la dilution des molécules, empêchant l'inhalation d'une plus grande quantité de substance irritante. Des réponses motrices globales permettent également d'écarter le stimulus potentiellement nocif.

### **III- Anatomie**

#### **3-1- Niveau périphérique**

La cavité nasale est innervée dans la partie haute par la branche ophtalmique (V1) et dans la partie basse par la branche maxillaire du complexe trijumeau (V2). Les fibres de ces branches projettent dans les noyaux trigéminaux du tronc cérébral, puis via le thalamus, vers le cortex somatosensoriel. Différents types de fibres sont impliqués dans la médiation des sensations trigéminales. L'activation des fibres non myélinisées (C-fibers) produit des sensations de brûlure, tandis que des sensations piquantes apparaissent après l'excitation des fibres myélinisées (*Adelta*-fibers) (Hummel, 2000). Le système trigéminal permet par l'intermédiaire de la nociception d'évaluer des caractéristiques de température, de pression ou d'acidité.

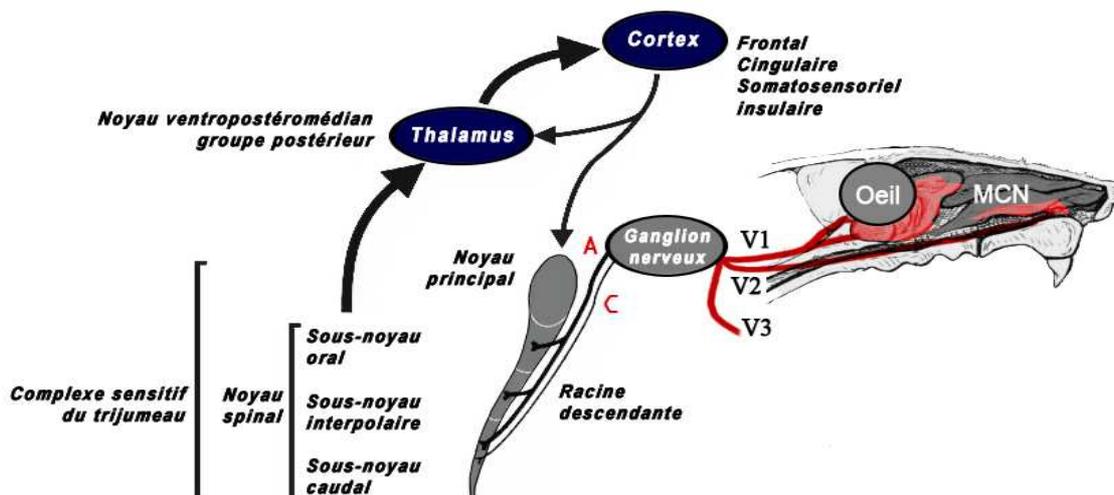
L'existence d'une double représentation de la douleur dans le complexe sensitif du trijumeau, au niveau des sous-noyaux caudal et oral, a été établie. L'essentiel du message douloureux est véhiculé par les fibres périphériques de type C démyélinisées qui se terminent dans le sous-noyau caudal. Ce dernier active à son tour les neurones nociceptifs du sous-noyau oral, qui ont des propriétés similaires à celles des neurones de la couche V de la corne dorsale de la moelle épinière. Les fibres A $\delta$ , myélinisées, se terminent quant à elles à la fois dans les trois sous noyaux, oral, interpolaire et caudal. Les fibres C portent en plus grande proportion les récepteurs VR1 (Vanilloid Receptor 1) (engagés notamment lors d'une élévation de température) que les extrémités A $\delta$  et sont impliquées en majeure partie dans l'initiation du message nociceptif.

De très nombreuses substances sensibilisent les nocicepteurs : bradykinine, histamine, prostaglandines et leucotriènes. Les fibres C sont majoritairement soumises à des sensibilisations, c'est-à-dire à une diminution du seuil de détection et une amplification de la réponse douloureuse. Les fibres A $\delta$  sont quant à elles majoritairement sujettes à des

désensibilisations ou à une augmentation du seuil de réponse nociceptive. Ces phénomènes de sensibilisation ou de désensibilisation, observés chez l'homme et apparaissant en cas de stimulations continues ou répétées, dépendent néanmoins du type de substance inhalée et de l'intervalle « inter-sniffs » (Brand, 2006).

### 3-2- Niveau central

Le complexe sensitif du trijumeau (Figure 13) transmet les messages nociceptifs vers un ensemble de régions corticales, l'amygdale ou l'hypothalamus, par l'intermédiaire de relais situés dans le thalamus, la formation réticulée bulbaire, le noyau parabrachial et le noyau du faisceau solitaire. Ces structures participent à l'intégration des différents aspects de la douleur: sensori-discriminatif, moteur, végétatif, émotionnel. Les aires corticales fonctionnent par le biais d'interactions réciproques avec le thalamus et d'une modulation directe des relais pré-thalamiques (Dallel *et al.*, 2003).



**Figure 13** : Organisation du complexe sensitif du trijumeau et de ses connexions chez le rongeur. Les voies ascendantes issues du complexe sensitif du trijumeau ou du thalamus, et les voies descendantes issues du cortex sont représentées. **A** : fibres myélinisées A $\delta$  ; **C** : fibres démyélinisées C ; **V1**: nerf ophtalmique ; **V2**: nerf maxillaire ; **V3**: nerf mandibulaire. En rouge, sont représentées les sous branches V1 et V2 intervenant dans la perception de l'irritation au niveau de la muqueuse de la cavité nasale (**MCN**). (D'après Dallel *et al.*, 2003).

Il existe au niveau central un ajustement permanent de l'amplification du message nociceptif sous la dépendance des récepteurs au glutamate de type N-méthyl-D-aspartate, impliqués notamment dans les processus de potentialisation à long terme. Le dérèglement des divers mécanismes de modulation constitue probablement un élément clé de la physiopathologie des douleurs chroniques trigéminales.

## **Partie 4 : Mécanismes de protection des voies olfactives et modes d'action des substances toxiques.**

L'inhalation est une voie majeure d'exposition aux substances chimiques présentes dans l'environnement. L'exposition continue de la cavité nasale, et par conséquent de la muqueuse olfactive, à des agents xénobiotiques souligne la nécessité de neutraliser ces composés via une activité de biotransformation. Les enzymes de biotransformation présentes dans le système olfactif ont pour rôle la clairance des molécules odorantes et la détoxification des agents xénobiotiques. Ces enzymes sont bien caractérisées dans le système olfactif principal, mais leur étude est moins approfondie dans le système voméronasal.

Ce chapitre traite dans une première partie des différentes sécrétions enzymatiques de la muqueuse nasale principale, et dans une deuxième partie des sécrétions enzymatiques dans l'épithélium voméronasal. Une dernière partie est consacrée au rôle de ces enzymes de biotransformation.

### **I- Mécanismes de protection de l'épithélium olfactif principal**

#### **1- Sécrétions de la muqueuse olfactive**

En raison de sa situation anatomique, la muqueuse olfactive est vulnérable aux polluants présents dans l'air inspiré. Cette muqueuse contient des cellules associées à des réactions inflammatoires et immunitaires, en particulier des neutrophiles, des cellules plasmatiques, des monocytes et des macrophages. La plupart des enzymes qui métabolisent les agents xénobiotiques sont situées dans les cellules de soutien, les conduits des glandes de Bowman et les cellules basales progénitrices. Les glandes de Bowman sécrètent du mucus, substance aqueuse composée d'un ensemble de mucopolysaccharides acides, sulfatés ou neutres. Ce mucus contient des composés jouant un rôle de défense et de protection de la muqueuse olfactive. Ces composés sont des lysozymes antimicrobiens et la lactoferrine, des constituants enzymatiques comme les aminopeptidases, des endopeptidases, des carboxypeptidases ou des peroxydases. Un certain nombre d'antioxydants sont également présents dans le mucus, comme le glutathion réduit, les mucines et un abondant antioxydant thiol spécifique. Le mucus nasal contient également des protéines et des peptides, incluant des leucoprotéases sécrétoires inhibiteurs, la substance P, le peptide

intestinal vasoactif, et des protéines de transport comme les protéines liant les molécules odorantes (dénommées OBP pour Odorant-Binding Proteins). Ces protéines résultent d'une transsudation du sérum, d'une synthèse locale ou d'une sécrétion.

La muqueuse nasale possède de fortes concentrations en enzymes de phase I (cytochrome P450) et en enzymes de phase II (UDP glucuronyl transférase, glutathion-S-transférases, sulfates transférases). Les molécules odorantes traversent les membranes des cellules de soutien grâce à leurs propriétés hydrophobes. Elles sont ensuite hydroxylées par les enzymes de phase I. Puis les produits des hydroxylations sont relayés aux enzymes de phase II. Au final, les produits de biotransformation s'accumulent dans le lumen du réticulum endoplasmique, puis sont externalisés par un mécanisme de sécrétion vésiculaire.

## **2- Enzymes de détoxification présentes dans la muqueuse olfactive**

### **2-1- Principale enzyme de phase 1 : le cytochrome P450**

Localisation : La « superfamille » génique P450 encode environ 500 monooxygénases structurellement similaires. Ces enzymes sont retrouvées en forte quantité dans l'épithélium olfactif (Dahl et Hadley, 1991). Elles sont localisées en particulier dans le réticulum endoplasmique lisse des cellules. Plus de dix cytochromes P450 différents ont été identifiés dans la muqueuse olfactive des mammifères. Dans la muqueuse olfactive de souris, la forme prédominante de cytochrome P450 est le CYP2A5 (Su *et al.*, 1996). Il est exprimé dans la partie apicale des cellules de soutien et dans les canaux excrétoires des glandes de Bowman (Piras *et al.*, 2003). L'expression des CYP2A5 et d'autres cytochromes dans la muqueuse olfactive serait nécessaire pour la protection des neurones olfactifs contre les dommages potentiels des produits toxiques (Adams *et al.*, 1991; Chen *et al.*, 1992). Certains CYP450 sont spécifiquement exprimés dans la muqueuse olfactive. C'est le cas par exemple des CYP2G1 (Hua *et al.*, 1997; Nef *et al.*, 1989).

Rôle : les cytochromes P450 sont des hémoprotéines qui jouent un rôle essentiel dans la bioactivation et la détoxification d'une large variété de substances xénobiotiques. Les substrats de ces cytochromes sont soit des substances participant au fonctionnement physiologique de l'organisme comme des hormones stéroïdes, des eicosanoïdes, des rétinoïdes, soit des agents xénobiotiques comme des médicaments, des procarcinogènes, composés polarisés facilement excrétés soit directement, soit après conjugaison avec des agents hydrosolubles comme l'acide glucuronique ou le glutathion.

## 2-2- Enzymes de phase 2

### a/ les glutathion S-transférases

Localisation : comme pour les enzymes de phase I, les glutathion S-transférases montrent différents patterns d'expression le long de l'axe rostro-caudal de la muqueuse nasale (Banger *et al.*, 1994 ; Robinson *et al.*, 2003). Elles sont réparties dans des zones spécifiques de la muqueuse olfactive, de façon prédominante dans les cellules de soutien et les glandes de Bowman des cornets olfactifs latéraux (Whitby-Logan *et al.*, 2004). Les glutathion S-transférases sont situées dans le cytosol des cellules, et certaines ont été retrouvées dans les microsomes et les mitochondries.

Rôle : les glutathion S-transférases catalysent la conjugaison des glutathiones réduites avec des substrats électrophiles, incluant des intermédiaires formés lors des réactions de catalyse du CYP450, ce qui diminue leur réactivité avec les protéines et d'autres macromolécules cellulaires (Armstrong, 1997; Eaton et Bammler, 1999).

### b/ les UDP glucuronyl transférases

Localisation : les UDP glucuronyl transférases (aussi appelées glycosyltransférases) sont localisées dans les glandes de Bowman et dans les cellules de soutien.

Rôle : Les UDP glucuronyl transférases catalysent la conjugaison des acides glucuronique UDP avec différents substrats (Mackenzie *et al.*, 1997). Les substrats de ces enzymes sont des agents xénobiotiques, comme des médicaments, des polluants, des additifs alimentaires, ou des composés endogènes comme des stéroïdes, des hormones thyroïdiennes, des vitamines et des rétinoïdes (Tephly, 1990). La glucuronidation conduit à la formation de glucuronides hydrophiles portant des groupements hydroxyle, carboxyle ou amines qui sont excrétés dans la bile et l'urine.

### c/ les sulfates transférases

Localisation : les sulfates transférases sont localisées principalement dans les cellules de soutien (Miyawaki *et al.*, 1996).

Rôle : les sulfates transférases catalysent le transfert d'un groupe sulfonate du 3'-phosphoadenosine-5'-phosphosulfate aux substrats comme des phénols, des énols, des

alcools ou des amines. Les produits de formation sont des monesters d'acide sulfuriques (Matsui et Homma, 1994). En fonction de leur substrat spécifique, elles sont classées en phénols sulfates transférases, hydroxystéroïdes sulfates transférases, oestrogènes sulfates transférases et flavonol sulfates transférases.

## **II- Mécanismes de protection de l'organe voméronasal**

### **1- Enzymes de détoxification présentes dans l'organe voméronasal**

#### **a/ Enzyme de phase 1 : le cytochrome P450**

Plusieurs isoformes du cytochrome P450 ont été identifiées dans l'OVN: CYP1A2, CYP2A, CYP2B, CYP2C, CYP2G1 et CYP3A (Gu *et al.*, 1999). Cependant, leur niveau d'expression est moins élevé que dans l'épithélium olfactif.

#### **b/ Enzyme de phase 2 : les glutathion S-transférases**

Une étude a montré l'expression de la glutathione-s-transférase et de trois isoformes alpha, mu et pi dans les épithéliums sensoriels et non-sensoriels de l'organe voméronasal (Green *et al.*, 2005). Les résultats de cette étude indiquent une forte localisation des glutathion S-transférases dans les corps cellulaires des neurones voméronasaux. Le rôle et l'influence des glutathion S-transférases sur la neurogenèse et la chimioréception reste à déterminer.

#### **c/ Autres enzymes de phase 2**

Aucune donnée concernant la présence d'autres enzymes de phase II, telles que les UDP glucuronyl transférases ou les sulfate transférases, n'a été trouvée dans la littérature.

## **III- Rôle des enzymes nasales**

### **3-1- Protection des tissus**

Les enzymes nasales assurent une protection partielle des autres tissus de l'organisme. A titre d'exemple, la capacité des carboxylestérases est suffisante pour détoxifier des concentrations d'ester inhalées allant de 1000 à 3000 ppm telle que l'acétate d'éther (Dahl,

1988). L'activité des enzymes rhodanèses nasales est suffisante pour détoxifier des concentrations inhalées en cyanide d'hydrogène de 2800 ppm chez le rat (Lewis *et al.*, 1991).

### **3-2- Modification des stimuli olfactifs**

Les métabolites des substances odorantes contribuent à la qualité des odeurs inhalées. En effet, ils sont plus solubles que les molécules odorantes elles-mêmes, et peuvent atteindre de fortes concentrations dans le mucus baignant les récepteurs olfactifs (Dahl, 1988 ; Price, 1984). Ils joueraient donc sur la sensibilité, l'intensité et la perception d'une odeur (Dahl, 1988 ; Price, 1986). Cependant, l'accumulation de substances odorantes lipophiles peut par ailleurs altérer le fonctionnement cellulaire. Ainsi, ces métabolites peuvent saturer les mécanismes de clairance des molécules odorantes, perturber la production énergétique des mitochondries, et supprimer ou sensibiliser les systèmes immunitaires locaux (Ding et Dahl, 2003).

### **3-3- Métabolites et toxicité**

Les enzymes de biotransformation, en particulier les enzymes P450, génèrent des intermédiaires réactifs des substances inhalées, ce qui peut entraîner une certaine toxicité. En effet, en cas de fortes concentrations inhalées, les métabolites réactifs s'accumulent et provoquent une cytotoxicité au niveau de la muqueuse nasale. Il a été montré (Dahl *et al.*, 1985) que les époxydes de benzopyrène, intermédiaires réactifs ayant une longue demi-vie, sont transportés dans des organes voisins comme le pharynx, le système olfactif principal, la cavité nasale antérieure et le bulbe olfactif. Dans ces organes, les activités enzymatiques de biotransformations sont plus faibles que dans la muqueuse nasale, et les époxydes de benzopyrène présentent donc une toxicité potentielle. De nombreux composés, comme le ferrocène (Sun *et al.*, 1991), l'acétaminophène (Genter *et al.*, 1998), le 2,6-dichlorobenzonitrile (Brittebo, 1997), ou la coumarine (Gu *et al.*, 1997) sont métabolisés en des substances toxiques susceptibles de produire des nécroses au niveau de l'épithélium olfactif.

#### **IV- Conclusion**

Le système olfactif est exposé en permanence à l'air ambiant, contenant de nombreux polluants atmosphériques. Sa position anatomique rend vulnérables les cellules présentes dans l'épithélium olfactif. Cependant, le système olfactif contient de nombreuses enzymes de biotransformation, jouant des rôles importants dans la détoxification des agents xénobiotiques inhalés. Ces enzymes ont une forte capacité métabolique, leurs substrats ont des origines variées, et leur expression est spécifique à un type cellulaire. Les enzymes de biotransformation sont de phase I ou de phase II. Elles altèrent les agents toxiques inhalés en les convertissant en des métabolites moins toxiques ou en les activant en composés chimiques réactifs pouvant conduire à des dommages locaux. Ces enzymes sont également présents dans l'organe voméronasal, mais des travaux supplémentaires seront nécessaires pour les identifier en totalité.

## **Partie 5 : Polluants et leurs effets au niveau de la cavité nasale**

D'après la directive du 30 décembre 1996 relative à la loi sur l'air et l'utilisation rationnelle de l'énergie, la pollution atmosphérique est définie comme « l'introduction par l'Homme, directement ou indirectement, dans l'atmosphère et les espaces clos, de substances ayant des conséquences préjudiciables de nature à mettre la santé humaine en danger, à nuire aux ressources biologiques et aux écosystèmes, à influencer sur les changements climatiques, à détériorer les biens matériels, à provoquer des nuisances olfactives excessives ». La pollution atmosphérique a des impacts négatifs sur les écosystèmes et sur l'environnement dans son intégralité, incluant l'espèce humaine. Certains produits sont soumis à des normes ou des seuils, établis par différents organismes français, européens ou américains. Cependant, il arrive que ces seuils soient dépassés, notamment dans le milieu industriel. De nombreux produits sont maintenant connus pour être toxiques pour l'organisme, mais tous les produits n'ont pas été testés et leurs effets évalués pour tous les organes cibles.

Dans cette partie seront présentées en premier lieu les différentes sources de polluants, en second lieu les modes de classification des polluants et en troisième lieu les caractéristiques des polluants étudiés, incluant différents solvants (toluène, acétone, pyridine) et un gaz atmosphérique, le dioxyde de carbone. Les études sur les effets des polluants au niveau de la cavité nasale des rongeurs et les études menées chez l'Homme seront exposées.

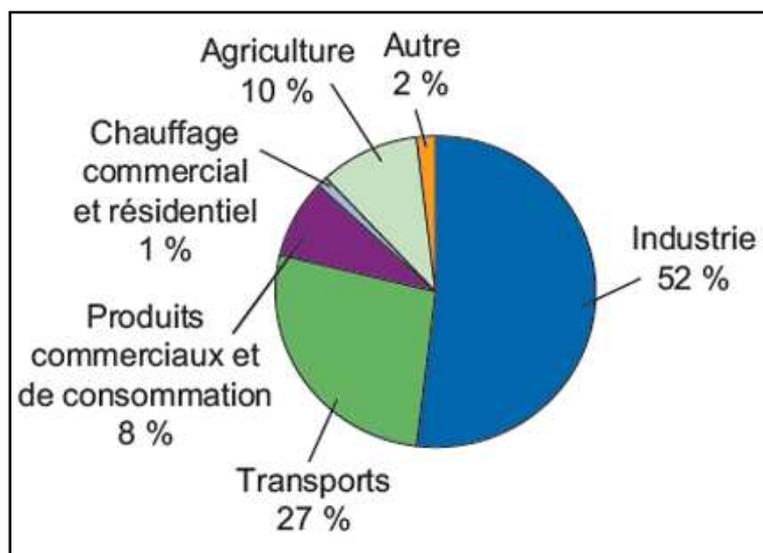
### **I- Sources des polluants**

Les polluants présents dans l'atmosphère ont des origines variées (Figure 14). Il existe une pollution d'origine naturelle représentée par les activités géologiques terrestres tel que le volcanisme (émission de soufre) et les événements météorologiques tels que les orages (apparition de dioxyde d'azote). Les combustions, comme les feux de forêt provoquent un dégagement de dioxyde de carbone. Même si les émissions de polluants par ces processus peuvent être importants à une échelle locale, elles ne représentent qu'une faible partie de la pollution à l'échelle planétaire. En effet, on constate que 99.8% du dioxyde de soufre (SO<sub>2</sub>) présent dans l'atmosphère provient des activités humaines, qui constituent une source majeure de pollution.

La pollution atmosphérique est donc en grande partie générée par l'Homme, et ce dans différents domaines. Les sources de pollution anthropiques sont variables, en fonction des

caractéristiques de l'endroit où la concentration en polluant est mesurée. Dans l'air extérieur, les sources sont les installations de combustion individuelles, collectives ou industrielles, qui fournissent le chauffage et l'énergie, les installations d'incinération de déchets et les installations industrielles et artisanales comme la métallurgie, les raffineries ou encore la pétrochimie. Les transports maritimes, aériens et surtout terrestres constituent également des sources de pollution. Dans les espaces intérieurs, on retrouve des pollutions de sources présentes dans l'air extérieur et citées précédemment, et d'autres sources liées d'une part aux activités professionnelles (peinture, scierie, fonderie de métaux...) et aux activités domestiques (bricolage..), et d'autre part constituées par les émissions dues aux matériaux de construction et de revêtement intérieur (produit d'hygiène, fibres minérales...). Le tabagisme constitue également une source importante de pollution intérieure.

Les principales sources de pollution atmosphérique sont donc liées aux activités d'origine anthropique comme les installations de combustion, les procédés industriels et artisanaux, l'incinération des déchets ménagers et industriels, et l'utilisation de véhicules à moteur.



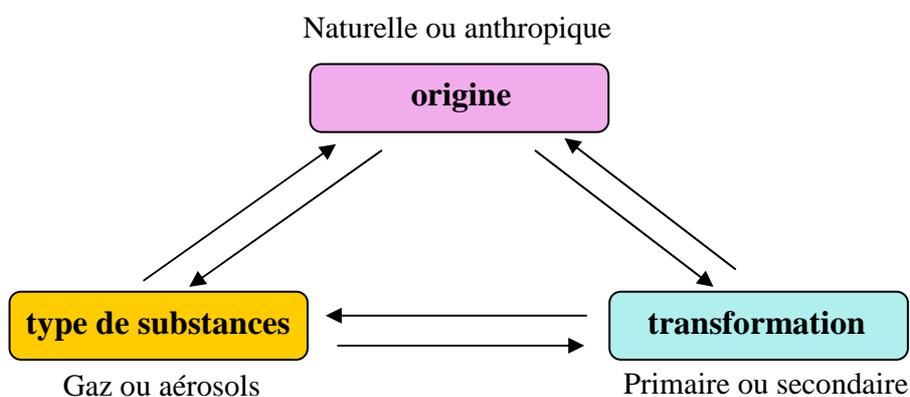
**Figure 14 :** Source d'émission de polluants atmosphériques  
(D'après le site internet : [www.ec.gc.ca/](http://www.ec.gc.ca/))

## **II- Classification**

Il existe plusieurs systèmes de classification des polluants, en fonction de critères variés, comme leurs origines, leur transformation dans l'atmosphère ou leurs caractéristiques physico-chimiques (Figure 15).

Les polluants atmosphériques peuvent être classés en deux catégories, les polluants primaires et les polluants secondaires. Les polluants primaires sont retrouvés à l'endroit de l'émission. Il s'agit par exemple du dioxyde de soufre (SO<sub>2</sub>) et du monoxyde de carbone (CO). Les polluants secondaires sont issus de la transformation physico-chimique des polluants primaires dans l'atmosphère. C'est le cas de l'ozone (O<sub>3</sub>) qui est produit par la combinaison du rayonnement solaire, d'oxydes d'azote et de composés organiques volatiles.

De nombreuses substances font l'objet de surveillance, par la réalisation régulière d'inventaire d'émission. En France, l'organisme de référence chargé de la réalisation technique de ces inventaires est le CITEPA (Centre Interprofessionnel d'Etude de la Pollution Atmosphérique), qui a pour fonction la mesure des émissions des principaux polluants atmosphériques par secteurs d'activité.



**Figure 15:** Critères de classification de la pollution de l'air (D'après le site internet : [www.atmosphere.mpg.de/](http://www.atmosphere.mpg.de/))

### III- Caractéristiques des polluants étudiés

#### **3-1- Les solvants**

Les solvants forment un ensemble de produits chimiques variés ayant pour caractéristiques essentielles un fort pouvoir solubilisant associé à une volatilité en général élevée. Cette forte volatilité a pour conséquence la présence de concentrations plus ou moins élevées à de nombreux postes de travail. L'exposition des travailleurs au solvant se fait principalement par voie respiratoire et par voie cutanée. En 2003, l'enquête SUMER 2003 réalisée par l'INRS a montré que 14,7% des salariés étaient exposés à des solvants, en particulier dans l'industrie et la construction (INRS, 2005a).

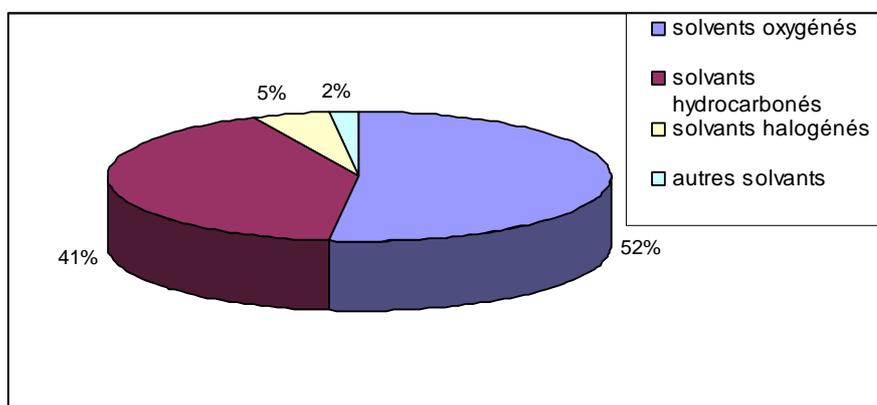
La plupart des solvants appartiennent à la catégorie des composés organiques volatiles. Les composés organiques volatiles regroupent de nombreuses substances ayant des origines naturelles et anthropiques. Ils contiennent un élément carboné auquel s'ajoute d'autres éléments comme l'hydrogène, l'oxygène ou le soufre. En raison de leurs risques pour la santé, les composés organiques volatiles sont désormais soumis à une réglementation, puisque la France s'est engagée sur le plan international, dans le cadre du protocole de Göteborg, à réduire ses émissions de composés organiques volatiles d'environ 40 % entre 1999 et 2010, en passant de 2300 kilotonnes émis en 1998 à 1100 kilotonnes en 2010. Actuellement, les émissions nationales sont en baisse, puisque les derniers chiffres publiés (CITEPA, 2006) indiquent des émissions de composés organiques volatiles d'environ 1400 kilotonnes en 2004.

Il existe quatre grandes familles de solvants organiques utilisés dans l'industrie : les solvants oxygénés, les solvants hydrocarbonés, les solvants halogénés et les autres solvants (Figure 16).

FAMILLE	TYPE DE PRODUITS
solvants oxygénés	alcools / cétones / éthers de glycol / éthers / esters
solvants hydrocarbonés	hydrocarbures aromatiques / solvants pétroliers
solvants halogénés	hydrocarbures halogénés
autres solvants	solvants particuliers dont amines, amides, terpènes...

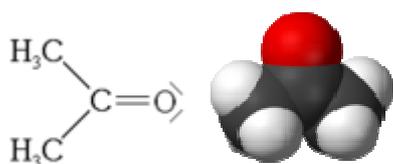
**Figure 16:** Classification des solvants

Fin 2004, la consommation globale de solvants en France était de 548 000 tonnes, avec principalement des solvants oxygénés (52%) et des solvants hydrocarbonés (41%) (Figure 17).



**Figure 17:** Consommation globale de solvants en France  
100% = 548 000 tonnes  
(D'après INRS, 2005a)

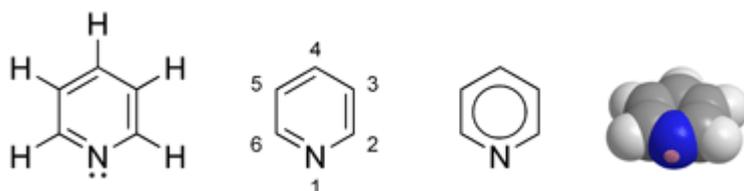
### a/ Acétone



**Figure 18:** Structure et représentation schématique de la molécule l'acétone.

L'acétone (C<sub>3</sub>H<sub>6</sub>O) (Figure 18) est un liquide incolore, extrêmement volatile, d'odeur suave et détectable à environ 13 ppm chez l'Homme (INRS, 2003). C'est une substance utilisée couramment comme solvant dans l'industrie des peintures, des vernis, des encres et des colles. Ce solvant est aussi utilisé comme intermédiaire de synthèse et solvant de l'acétylène. C'est un très bon solvant d'un grand nombre de produits organiques et minéraux. Après inhalation, l'acétone est rapidement absorbée par les voies respiratoires et distribué uniformément dans les tissus non adipeux. Elle ne s'accumule pas dans les tissus adipeux et est rapidement métabolisé par le foie. La principale voie d'élimination se fait par rejet de CO<sub>2</sub>, et sous forme inchangée exhalée pour les fortes doses. La demi-vie moyenne dans l'air de l'acétone est de 22 jours.

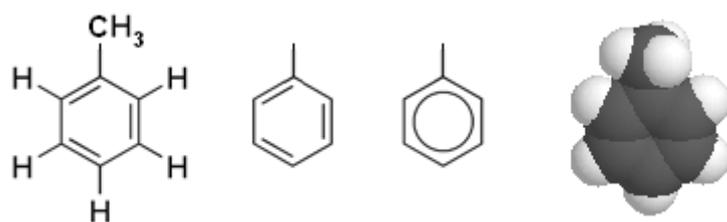
### b/ Pyridine



**Figure 19:** Structure et représentation schématique de la molécule de pyridine.

La pyridine (C<sub>5</sub>H<sub>5</sub>N) (Figure 19) est un liquide incolore ou légèrement jaunâtre. Son odeur âcre est caractéristique, désagréable, détectable par l'Homme à des concentrations faibles, très inférieures à 1 ppm (INRS, 2001). C'est une substance largement utilisée comme solvant de produits organiques divers. La pyridine est également utilisée dans la fabrication de médicaments, de vitamines, dans l'industrie du caoutchouc et de matières colorantes, dans la préparation d'herbicides et de pesticides. La pyridine est absorbée par le tractus gastro-intestinal, les poumons et la peau. Elle est éliminée, sous forme inchangée ou métabolisée, en majorité par l'urine mais aussi par les fèces. Sa demi-vie dans l'air varie de 10 à 20 jours.

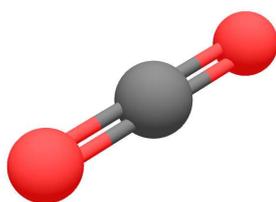
### c/ Toluène



**Figure 20:** Structure et représentation schématique de la molécule de toluène.

Le toluène ( $C_7H_8$ ) (Figure 20) est un liquide incolore, modérément soluble dans l'eau, mais miscible avec la plupart des solvants organiques (INRS, 2004). Chez l'Homme, le seuil de détection olfactif est d'environ 2,9 ppm (Amoore et Hautala, 1983). Il est utilisé comme intermédiaire de synthèse dans la fabrication de nombreux produits chimiques (benzène, xylène, phénol...). C'est également un solvant pour les peintures, vernis, encres, colles, cires. Présents dans certains produits pétroliers, il est également utilisé en mélange avec le benzène et les xylènes comme additif de carburant pour améliorer l'indice d'octane. Le toluène est absorbé par voie gastro-intestinale et par voie respiratoire. L'absorption respiratoire est rapide, et le toluène apparaît dans le sang après 10 à 15 minutes d'exposition. Il se distribue dans les tissus adipeux, en particulier le cerveau. Il est ensuite éliminé tel quel dans l'air expiré et après transformation dans l'urine, principalement sous forme d'acide hippurique. Dans l'air, sa demi-vie moyenne est estimée à 60 heures.

### 3-2- Un polluant atmosphérique : le dioxyde de carbone ( $CO_2$ )

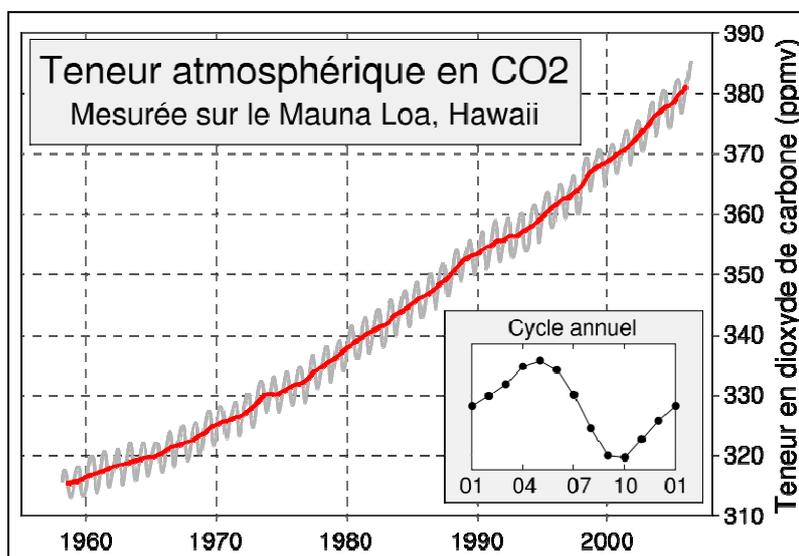


**Figure 21:** Structure et représentation schématique de la molécule de dioxyde de carbone

Le dioxyde de carbone est un gaz atmosphérique composé d'un atome de carbone et de deux atomes d'oxygènes (Figure 21). Ce gaz incolore, irritant, plus lourd que l'air et stable à température ambiante, est présent à l'état naturel dans l'atmosphère et sa concentration varie de 0,03% à 0,06% (INRS, 2005b). Il est en effet libéré naturellement lors de combustions, de putréfactions et de fermentations alcooliques.

Il est fréquemment utilisé dans l'industrie agroalimentaire (conservation et gazéification de boissons, refroidissement et congélations de denrées alimentaires..), dans le

refroidissement des caoutchoucs et des matières plastiques, dans l'extinction des feux, dans le traitement de l'eau, dans les cultures sous serres et à fin d'applications médicales (lasers, cryothérapie...).



**Figure 22:** Courbes d'émissions de CO<sub>2</sub> de 1958 à 2004 mesurée à Mauna Loa, dans l'île d'Hawaii. La concentration en CO<sub>2</sub> est exprimée en partie par million en volume (ppmv). La courbe grise indique la teneur moyenne mensuelle de CO<sub>2</sub>, et la courbe rouge représente la moyenne annuelle. Le cycle de fluctuation annuel est présenté dans l'encadré en bas à droite. (D'après le site internet : [www.globalwarmingart.com](http://www.globalwarmingart.com))

La concentration en CO<sub>2</sub> est en constante augmentation depuis les années 1960 (Figure 22). L'enregistrement systématique de la concentration atmosphérique en CO<sub>2</sub> date de 1958 avec la création d'un programme de monitoring à l'observatoire de Manua Loa situé à Hawaii (Keeling *et al.*, 1995). En 1959, la concentration atmosphérique en CO<sub>2</sub> à cet endroit était de 316 ppm ; en 2004, elle est de 380 ppm. Ce gaz est actuellement considéré comme un polluant atmosphérique primaire, en raison de son accroissement régulier et de son implication dans l'effet de serre (Bertoni *et al.*, 2004).

### 3-3- Récapitulatif des propriétés des polluants étudiés

Dans les deux tableaux suivants sont indiquées les caractéristiques principales des polluants étudiés (Figures 23 et 24) ainsi que les valeurs limites autorisées d'exposition à ces substances suivant les normes appliquées en France, en Allemagne, dans l'Union Européenne et aux Etats-Unis.

Polluant	Formule chimique	numéro CAS (1)	Masse molaire g/mol	Densité de vapeur (air = 1)	Utilisation
Dioxyde de carbone	CO <sub>2</sub>	124-38-9	44,01	1,53	industrie agroalimentaire, extinction de feux, combustions...
Pyridine	C <sub>5</sub> H <sub>5</sub> N	110-86-1	79,1	2,73	solvant, fabrication de produits pharmaceutiques, industrie diverses...
Toluène	C <sub>7</sub> H <sub>8</sub>	108-88-3	92,14	3,14	Intermédiaire de synthèse (fabrication de benzène, xylènes...), solvants pour peintures, encres, vernis...
Acétone	C <sub>3</sub> H <sub>6</sub> O	67-64-1	58,08	2	solvant (industrie des peintures encres et colle), intermédiaire de synthèse.

**Figure 23:** Propriétés physico-chimiques des polluants étudiés et leurs utilisations.

(1) Numéro CAS : numéro d'enregistrement unique d'un produit chimique, polymère, séquence biologique ou alliage auprès de la banque de données de Chemical Abstracts Service (CAS), une division de American Chemical Society (CAmS).

Polluant	Etats-Unis		Valeur MAK <sup>(3)</sup>	France		Union européenne
	TLV-TWA <sup>(1)</sup>	TLV-STEL <sup>(2)</sup>		VME <sup>(4)</sup>	VLE <sup>(5)</sup>	
Dioxyde de carbone	5000	30000	5000	NC	NC	NC
Pyridine	5	10	5	5	10	NC
Toluène	100	150	50	100	150	NC
Acétone	500	750	500	750	NC	500

**Figure 24:** Valeur limite d'exposition aux polluants étudiés.

NC : Non Communiquée

(1) TLV-TWA : Threshold Limit values (Etats-Unis), concentration moyenne pondérée dans le temps pour une journée de travail de 8 heures et une semaine de travail de 40 heures.

(2) TLV-STEL : Threshold Limit values (Etats-Unis), concentration maximale pour une période d'exposition de 15 minutes.

(3) Valeur MAX : Maximale, Arbeitsplatz-Konzentration ou concentration maximale sur les lieux de travail est la concentration maximale admissible qui, dans l'état des connaissances actuelles, n'altère généralement pas la santé du travailleur. La valeur MAK est une valeur moyenne pondérée sur une journée de travail de 8 heures pour une semaine de 40 heures.

(5) VME : concentration maximale admissible, pour une substance donnée, dans l'air du lieu de travail, où le travailleur est amené à travailler une journée entière (sur la base de 8h/jour).

(6) VLE : la concentration maximale admissible, pour une substance donnée, dans l'air du lieu de travail, à laquelle le travailleur peut être exposé pour une courte durée (c'est-à-dire inférieure ou égale à 15 minutes)

La figure 24 indique les valeurs limites autorisées d'exposition aux différents polluants étudiés. En France, les valeurs limites autorisées d'exposition professionnelle sont décomposées en valeurs limites d'exposition à court terme, dont le respect permet d'éviter

le risque d'effets toxiques immédiats ou à court terme, sur une durée maximale de 15 minutes et en valeurs limites moyenne d'exposition, définies dans le but de protéger les travailleurs sur la durée d'un poste de travail de 8 heures.

D'autres systèmes de valeurs limites sont définis dans divers pays. Aux Etats-Unis, les seuils limites d'exposition (TLV-TWA et TLV-STEL) sont estimés par l'American Conference Governmental Industrial Hygienists (ACGIH). En raison de l'utilisation des mêmes sources d'information, et des mêmes démarches suivies, les valeurs établies par l'ACGIH sont souvent utilisées comme repères en l'absence de valeur limite nationale. En Allemagne, les valeurs limites d'exposition à une substance donnée sont fixées par la commission MAK.

#### **IV- Effets des polluants sur la cavité nasale chez le rongeur**

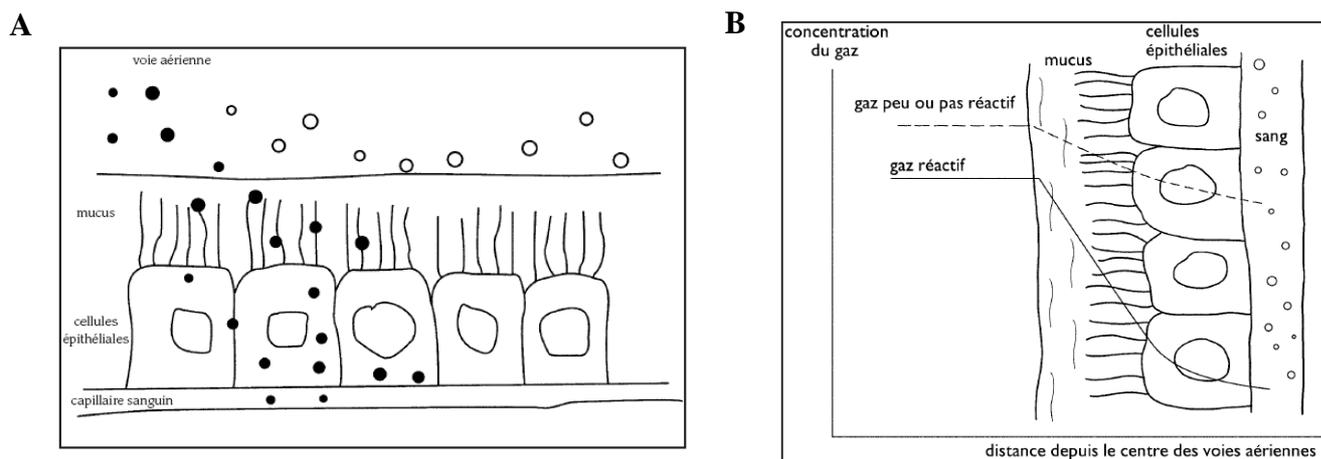
##### **4-1- Effets sur l'épithélium olfactif principal et facteurs de variation**

Les mécanismes par lesquels un polluant induit une toxicité sur la cavité nasale sont complexes et le risque pour qu'une substance chimique présente des effets toxiques au niveau de la cavité nasale et de l'organisme en général dépend de facteurs multiples. La voie d'exposition constitue un premier facteur de variation. L'exposition à des substances toxiques peut se faire par inhalation, ingestion (dans la nourriture ou dans l'eau ingérée), par voies cutanée et oculaire, et par la circulation systémique. La durée de l'exposition est également un paramètre déterminant. Celle-ci peut être aiguë (de l'ordre de quelques secondes à quelques minutes), subchronique (de l'ordre de quelques jours à quelques semaines) ou chronique (de l'ordre de quelques mois à quelques années). La structure et les propriétés physico-chimiques de la molécule inhalée vont permettre de prévoir dans certains cas la toxicité et les mécanismes d'action de cette molécule sur un tissu donné. En effet, les molécules possédant un ou plusieurs cycles aromatiques sont souvent toxiques. La concentration du produit inhalé constitue un paramètre essentiel dans l'interprétation des effets observés. De plus, la réaction et les interactions avec d'autres substances présentes dans l'air ambiant peuvent influencer et modifier la toxicité initiale d'une molécule donnée. Un autre facteur de variation de l'impact toxique est l'état de sensibilité de l'organisme. Les effets observés peuvent alors varier en fonction de l'âge, du genre, du régime alimentaire et de l'état de santé général de l'individu. Enfin, suite à une exposition, il faut tenir compte de l'existence d'une période de latence. En effet, en fonction des

conditions d'exposition et de la substance inhalée, l'apparition des premiers effets sera détectée à court terme, moyen ou long terme. De nombreux facteurs interviennent donc dans les effets d'un polluant inhalé sur la muqueuse nasale.

### a/ Gaz et vapeur

Les propriétés chimiques et physiques des gaz et vapeurs varient considérablement. Afin de prévoir le site et les mécanismes d'action d'un gaz ou des vapeurs inhalés au sein des tissus du tractus respiratoire, il faut se référer à deux propriétés essentielles : leur solubilité et leur réactivité avec le tissu (Medinsky et Bond, 2001). Les gaz solubles dans l'eau vont pouvoir se dissoudre dans le mucus puis diffuser dans les cellules épithéliales du système respiratoire (Figure 25 A). Les gaz peuvent être classés en gaz inertes et en gaz réactifs. Un gaz réactif interagit avec les composants du mucus, et sa concentration va alors baisser très rapidement. En revanche, un gaz inerte ne va pas réagir avec le mucus et rester à de fortes concentrations (Figure 25 B).



**Figure 25:** A : Solubilité des gaz et vapeur : un gaz très hydrosoluble (en noir) va pénétrer dans la muqueuse olfactive, tandis qu'un gaz peu hydrosoluble (en blanc) va agir en aval au niveau des poumons.

B : Réactivité d'un gaz (D'après Medinsky et Bond, 2001).

### b/ Solvants

En raison de leur caractère lipophile, les solvants atteignent rapidement la muqueuse nasale et pénètrent dans les membranes cellulaires. Ils peuvent également entrer dans la circulation sanguine par les capillaires nasaux, et traverser la barrière cérébrale, produisant dans des cas extrêmes une atrophie des structures cérébrales centrales, comme les lobes frontaux ou le cervelet (Hormes *et al.*, 1986).

#### 4-2- Etudes toxicologiques menées chez l'animal

Un nombre croissant de produits chimiques sont maintenant connus pour induire des modifications morphologiques de la muqueuse olfactive des rongeurs, suite à une exposition par inhalation (Gaskell, 1990). Ces dernières années, de nombreuses études ont montré que la cavité nasale des rongeurs était une cible importante pour des agents potentiellement toxiques, et qu'une large variété de composés incluant des polluants environnementaux (Johnson *et al.*, 1990 ; Bascom *et al.*, 1995), des médicaments (Johansson, 1981 ; Hart *et al.*, 1995), des herbicides (Brandt *et al.*, 1990), et des produits chimiques industriels (Reed *et al.*, 1995 ; Morgan *et al.*, 1997) pouvaient entraîner des lésions de la muqueuse olfactive et l'apparition de tumeurs chez l'animal (Figure 26).

Composé	Concentration	Durée d'exposition	Effets au niveau histologique et fonctionnel	Références
Acétaldéhyde	400-5000 ppm	6h/j 5j/sem pendant 1 à 28 mois	Dégénération, perte de glandes de Bowman, métaplasie	Appelman <i>et al.</i> , 1982
Acide acrylique	5-75 ppm	6h/j 5j/sem pendant 13 sem	Dégénération, remplacement par de l'épithélium respiratoire, inflammation	Miller <i>et al.</i> , 1981
Chloroforme	300 ppm	6h/j pendant 1 sem	Dégénération des glandes de Bowman	Mery <i>et al.</i> , 1994
Diméthylamine	10-511 ppm	6h/j, 5j/sem pendant 6 à 12 mois	Hypertrophie des glandes de Bowman	Buckley <i>et al.</i> , 1984
Formaldéhyde	0,25-15 ppm	6h/j, 5j/sem pendant 4 mois	Diminution de neurones olfactifs, augmentation des cellules basales	Apfelbach, 1991
Méthylbromide	200 ppm	4h/j 4j/sem	Dégénération de l'épithélium olfactif	Hastings et Evans, 1991
Dioxyde de soufre	10-117 ppm	72h, ou 6h/j pendant 5j	Nécrose, œdème, hypertrophie	Giddens et Fairchild, 1972

**Figure 26:** Effets de l'exposition à des polluants sur l'épithélium olfactif des rongeurs.

Concernant l'épithélium olfactif, une exposition de 400 à 5 000 ppm d'acétaldéhyde, ou de 300 ppm de chloroforme induit une dégénération des glandes de Bowman, une hypertrophie de ces glandes étant observée lors de l'exposition à 10 à 511 ppm de

diméthylamine. Une exposition de 0,25 à 15 ppm de formaldéhyde, composé largement utilisé dans l'industrie chimique pour la synthèse de produits organiques, a pour conséquence une diminution des neurones olfactifs et une augmentation du nombre de cellules basales. Enfin, une nécrose, des œdèmes et une hypertrophie de l'épithélium olfactif sont observés lors de l'inhalation de concentration allant de 10 à 117 ppm de dioxyde de soufre, un des principaux polluants atmosphériques.

L'exposition à des substances toxiques volatiles peut également altérer les autres types d'épithéliums présents dans la cavité nasale et entraîner des nécroses, des inflammations, des hyperplasies et des hyperkératinisations de l'épithélium squameux longeant le vestibule.

### **a/ Acétone**

#### Effets généraux

Des études comportementales n'ont montré aucun trouble chez des rats exposés à 3 000 ppm d'acétone, pendant 4 heures par jour et 5 jours par semaine (INRS, 2003). Des expositions aiguës à des concentrations allant de 12 600 à 50 600 ppm ont montré une atteinte du système nerveux central chez des souris et des rats. Des signes d'irritations des muqueuses oculaires et respiratoires, ainsi que des atteintes rénales et hépatiques, sont observés chez des animaux lors d'expositions aiguës à de fortes concentrations d'acétone. L'exposition par inhalation de 19 000 ppm d'acétone pendant 8 semaines entraîne une diminution réversible du poids du cerveau (Bruckner et Peterson, 1981). La concentration létale chez le rat est de 32 000 ppm pour une exposition de 4 heures (Pozzani *et al.*, 1959). Enfin, l'acétone ne serait ni mutagène, ni tératogène, ni cancérigène (INRS, 2003).

#### Effets sur la cavité nasale

Aucune donnée concernant les effets de l'exposition à l'acétone sur la cavité nasale, et en particulier sur l'épithélium olfactif, n'est actuellement publiée. Toutefois, chez la souris, une concentration d'acétone de 23 480 ppm correspondant au seuil d'irritation sensoriel, est responsable d'une diminution de 50% de la fréquence respiratoire (De Ceaurriz *et al.*, 1981).

## **b/ Pyridine**

### Effets généraux

Les quelques données publiées concernant les effets de la pyridine sont issues de recherches menées chez l'animal, et en particulier chez le rat. Par des expositions subchroniques à ce solvant (Kristesashvili, 1965 ; Perov, 1973), des études ont montré des effets au niveau pulmonaire. De plus, d'autres travaux ont révélé que l'exposition à la pyridine entraînait une augmentation du taux de cytochrome P450 dans le foie (Hotchkiss *et al.*, 1993) et dans l'épithélium olfactif principal. Chez le rat, la concentration létale (CL50, provoquant 50% de mortalité dans une population donnée) est de 9 000 ppm pour une heure d'exposition.

### Effets sur la cavité nasale

Nikula et Lewis (1994) ont mis en évidence des lésions de l'épithélium olfactif chez des rats exposés à 5 ppm ou 444 ppm pendant 6 heures par jour durant 4 jours. Ces lésions sont constituées de dégénération vacuolaires des cellules de soutien, d'une perte de neurones et de présence de structures lumineuses intranasales, les lésions observées à 444 ppm n'étant que légèrement plus sévères à celles observées à 5 ppm.

## **c/ Toluène**

### Effets généraux

La concentration létale (CL50, provoquant 50% de mortalité dans une population donnée) chez le rat est de 7 500 ppm pour une exposition de 4 heures. Chez la souris, elle varie de 5 308 à 7 440 ppm pour une exposition de 4 heures. L'exposition aiguë au toluène entraîne chez les souris et les rats une augmentation de la fréquence respiratoire, une hyperactivité, suivies d'ataxie et d'une perte d'équilibre postural. D'autres effets apparaissent conjointement, comme une modifications du taux de neurotransmetteurs (Win-Shwe *et al.*, 2007), une neurotoxicité au niveau de l'hippocampe et du cervelet (Korbo *et al.*, 1996), et une perte auditive (Crofton *et al.*, 1994). Des modifications des paramètres sanguins sont également observées, comme une baisse du nombre de leucocytes et une augmentation de l'hématocrite. L'exposition aiguë au toluène a également une incidence hépatique par l'augmentation du poids du foie et des enzymes hépatiques impliquées dans le métabolisme du toluène, à partir d'une exposition à 795 ppm.

### Effets sur la cavité nasale

Les études concernant les effets de l'inhalation de toluène sur la cavité nasale sont quasiment inexistantes. Des données (INRS, 2004) signalent qu'une exposition longue de 2 ans à 1 500 ppm de toluène produit une inflammation de la muqueuse nasale avec atteinte de l'épithélium olfactif, métaplasie et dégénérescence de l'épithélium respiratoire. Récemment, une étude du Laboratoire de Neurosciences de Besançon (Jacquot *et al.*, 2006) [ANNEXE 1] a évalué les effets comportementaux et histologiques chez la souris pendant une période d'exposition à une forte concentration de toluène (1 000 ppm en moyenne au cours de l'exposition), 5 heures par jour, 5 jours par semaine pendant 4 semaines et dans les 4 semaines suivant l'exposition. Les mesures sont effectuées chaque semaine de S0 (avant exposition) à S8 (dernière semaine de post-exposition). Les tests comportementaux utilisent un labyrinthe en T où chacune des deux branches contient (aléatoirement) soit un papier filtre imbibé avec 200 µL de toluène dilué à 10%, soit 200 µL d'eau distillée utilisée comme contrôle. Le toluène est une odeur particulièrement répulsive pour les souris puisque la moyenne d'occupation de la branche du labyrinthe contenant le toluène est de 20 secondes à S0, pour une durée totale de présence dans le labyrinthe de 5 minutes. Au cours de la première semaine d'exposition (S1) les souris évitent massivement le compartiment contenant le toluène (10 secondes de présence en moyenne) puis au cours des trois semaines suivantes d'exposition, le temps passé dans le compartiment toluène augmente (40 secondes en moyenne à S3 et S4). Au cours de la période de post-exposition, l'augmentation du temps de présence des souris dans le compartiment toluène continue à augmenter (50 secondes en moyenne à S5, S6 et S7) puis ce temps de présence diminue fortement à S8 pour revenir à une valeur moyenne (20 secondes) similaire à celle mesurée avant l'exposition (S0). Ces modifications peuvent être liées principalement soit à un phénomène d'habituation, soit une modification de réactivité comportementale (approche-évitement) aux odeurs. De nombreuses expérimentations contrôle menées au Laboratoire de Neurosciences de Besançon ont montré que sur plusieurs semaines - en dehors de toute exposition à des substances volatiles toxiques - le comportement des souris vis-à-vis des odeurs ne variait pas significativement. Ainsi, les mesures effectuées dans le labyrinthe en T suggèrent que l'exposition au toluène entraîne une modification de la réactivité aux odeurs qui s'avère plus répulsive en tout début d'exposition (S1) pour devenir moins répulsive en cours et fin d'exposition (S2, S3, S4) et

en début de période post-exposition et finalement revenir (S8) à une réactivité proche de celle observée avant l'exposition.

Les données histologiques hebdomadaires quantifient l'épaisseur et le nombre de cellules au sein de l'épithélium par marquage à l'hématoxyline. Une atteinte structurale progressive de l'épithélium olfactif se matérialise au cours de la période d'exposition (S1 à S4) avec une diminution significative de l'épaisseur et du nombre de cellules. Au cours de la période de post-exposition (S5 à S8) l'épithélium olfactif recouvre progressivement son intégrité par une augmentation des deux paramètres histologiques.

Ainsi, l'exposition au toluène entraîne des effets délétères sur le système olfactif périphérique et des modifications comportementales vis-à-vis de cette odeur, les modifications de ces deux paramètres étant relativement bien corrélées. Ces effets ne sont pas irréversibles puisque dans la période qui suit l'exposition, un retour progressif à des valeurs mesurées initialement avant l'exposition est noté, tant au niveau histologique qu'au niveau comportemental.

## **Chapitre II : Données expérimentales**

## Partie 1 : Matériel et Méthode

### A : Protocoles d'exposition

#### I-Animaux

Afin de constituer des groupes homogènes d'individus adultes, chaque étude porte sur 20 souris femelles OF1 âgées de trois mois au début de chaque expérimentation (10 animaux sont utilisés pour les tests comportementaux et 10 animaux sont utilisés pour les mesures histologiques). Ces animaux sont individualisés à l'aide d'un marquage à l'encre de chine sous les pattes (Figure 30). En dehors des expositions et des tests comportementaux, les souris sont réparties par lot de 10 dans deux boîtes d'élevage standard. Elles sont maintenues dans l'animalerie du laboratoire de Neurosciences (Besançon), dans des conditions standard de température ( $22^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ ) et d'humidité, sous un cycle de lumière de 8h à 20h. Ces animaux disposent d'eau et de croquettes *ad libitum*. Il faut noter que dans l'animalerie où sont placées les souris OF-1 femelles utilisées dans les études suivantes, des souris mâles de même souche sont également présents. Les souris femelles sont donc en contact permanent avec les molécules volatiles issues des souris mâles.



**Figure 30:**  
individualisation des  
souris par marquage au  
niveau des pattes

#### II- Conditions d'exposition

Deux types d'expositions appelées "exposition de courte durée" et "exposition de longue durée" sont réalisés (Figure 31). Les expositions de courte durée se déroulent sur 5 heures/jour et 5 jours/semaine pendant un mois (et sont suivies d'une période de post exposition d'une durée d'un mois). Les expositions de longue durée se déroulent sur 5 heures/jour et 5 jours/semaine pendant cinq mois (sans période de post exposition) ou 12 heures/jour et 5 jours/semaine pendant un mois (suivi d'une période de post exposition d'un mois).

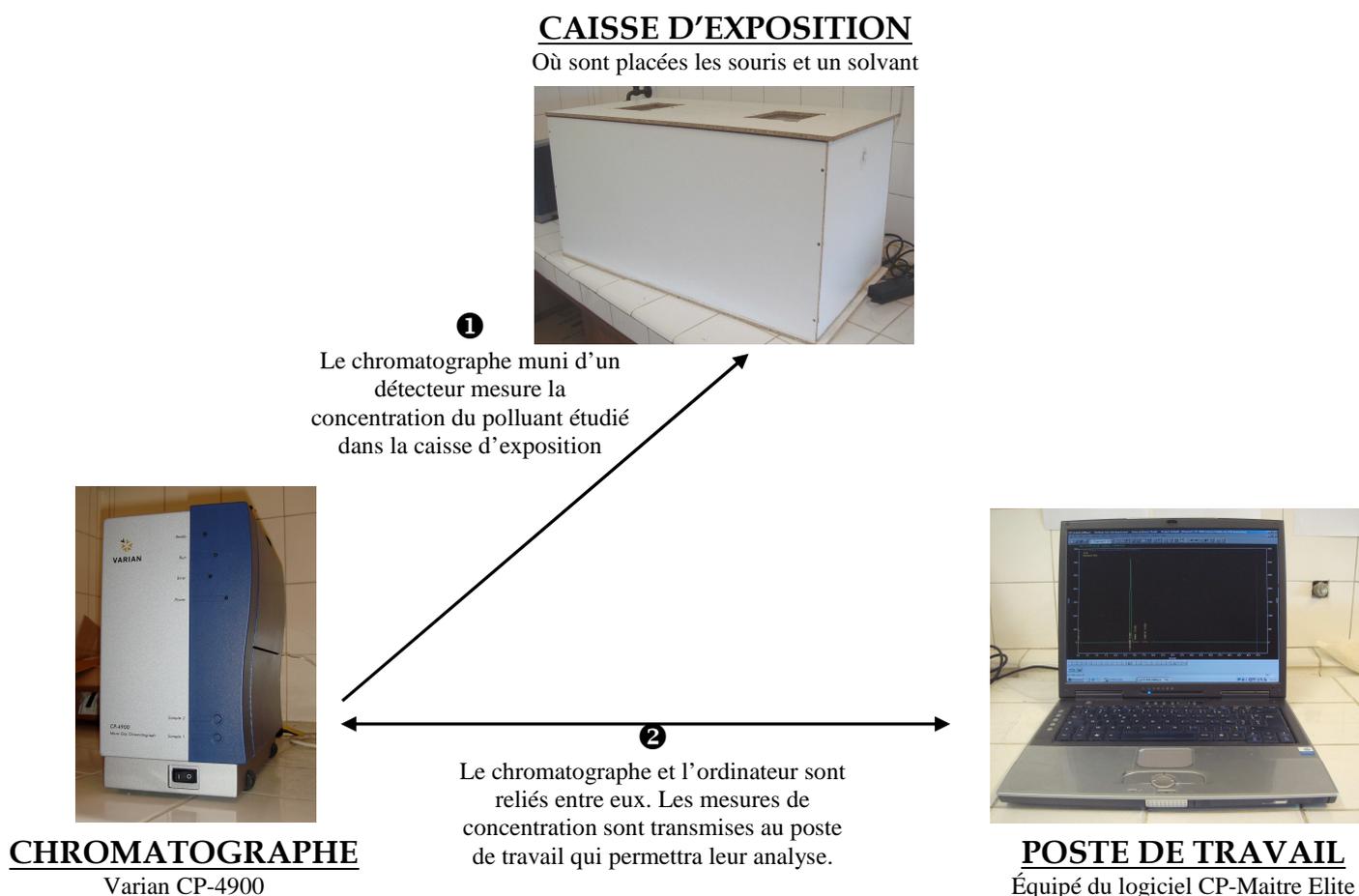
Type d'exposition	Conditions d'exposition	Exposition	Post-Exposition
Courte durée	5h/j et 5j/ semaine	1 mois	1 mois
Longue durée	5h/j et 5j/ semaine	5 mois	–
	12h/j et 5j/semaine	1 mois	1 mois

**Figure 31:** Conditions d'exposition pour les expositions de courte et de longue durée.

Ces protocoles d'exposition sont comparables à ceux suivis lors d'exposition à des substances volatiles (Monticello *et al.*, 1991; Newton *et al.*, 2002). Les expositions de courte durée sont des expositions subchroniques, où la durée d'exposition est similaire à celles retrouvée dans le milieu industriel.

## 2-1- Analyses chromatographiques

Les différentes analyses de mesures de concentrations en produit d'exposition se font par chromatographie en phase gazeuse. L'instrument analytique utilisé est un Micro-GC CP-4900 (Varian, Inc.), conçu pour l'analyse des gaz et des vapeurs. Le gaz vecteur est l'hélium. Le Micro-GC CP-4900 est connecté à un ordinateur qui permet de fixer les méthodes d'analyse et d'acquérir les données par l'intermédiaire du logiciel CP-Maitre Elite version 3.2, permettant le contrôle de l'analyse de chromatographie en phase gazeuse et le traitement des données (Figure 32). Le détecteur est à conductibilité thermique micro-usiné (TCD). L'injecteur est micro-usiné avec un volume d'injection pouvant être configuré par logiciel.



**Figure 32 :** Schéma de l'installation pour les analyses en chromatographie en phase gazeuse.

Avant d'effectuer les mesures, plusieurs paramètres d'analyse sont programmés (Figure 33). Les analyses chromatographiques sont réalisées à une pression de 150 kPa, et une température de colonne de 160°C pour une durée d'analyse de 50 secondes, période de temps durant laquelle les données seront acquises. La durée d'injection du gaz à analyser, soit le temps pendant lequel la vanne d'injection reste ouverte, est de 100 millisecondes. Le temps de prélèvement de l'échantillon, c'est-à-dire le temps pendant lequel la pompe est actionnée pour amener l'échantillon dans le boucle d'injection, est de 20 secondes, et son traitement est effectué à une fréquence de 100 par seconde. La sensibilité choisie est automatique, car elle permet d'obtenir un bas niveau de bruit.

Pour chaque produit d'exposition, plusieurs analyses chromatographiques ont été réalisées afin de déterminer la quantité de produit nécessaire à placer dans la caisse d'exposition pour obtenir la concentration choisie. Pour chaque substance, un étalonnage est réalisé au préalable, permettant de déduire les concentrations en ppm en acétone, pyridine et toluène.

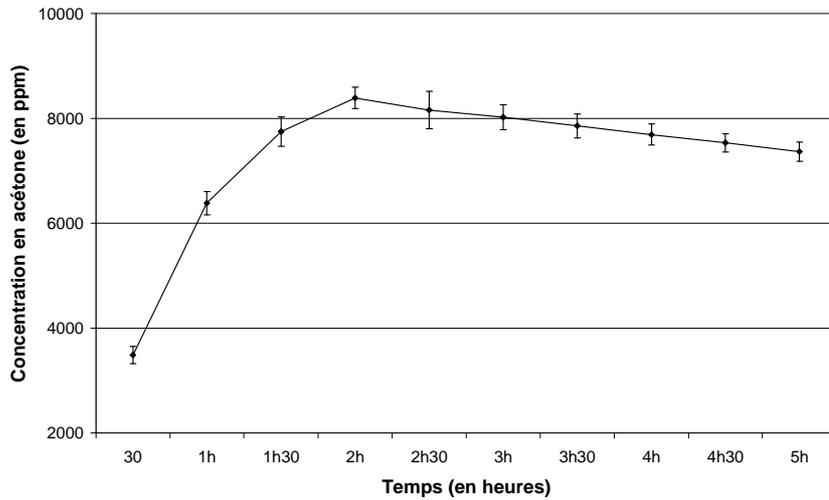
<b>Paramètres</b>	<b>Données</b>
Température de la colonne	160 °C
Température de l'injecteur	100 °C
Durée de l'injection	100 mSec
Durée de l'analyse	50 Sec
Pression de la colonne	150 kPa
Délai d'acquisition	0 Sec
Fréquence de traitement des échantillons	100 par Sec
Temps de prélèvement de l'échantillon	20 Sec
Temps de stabilisation	2 Sec
Sensibilité	automatique
Mode de pression	statique
Gaz Vecteur	Hélium

**Figure 33:** Paramètres de configuration des analyses chromatographiques par le Micro-GC CP-4900.

## **2-2- Mesures chromatographiques**

### **a/ Acétone**

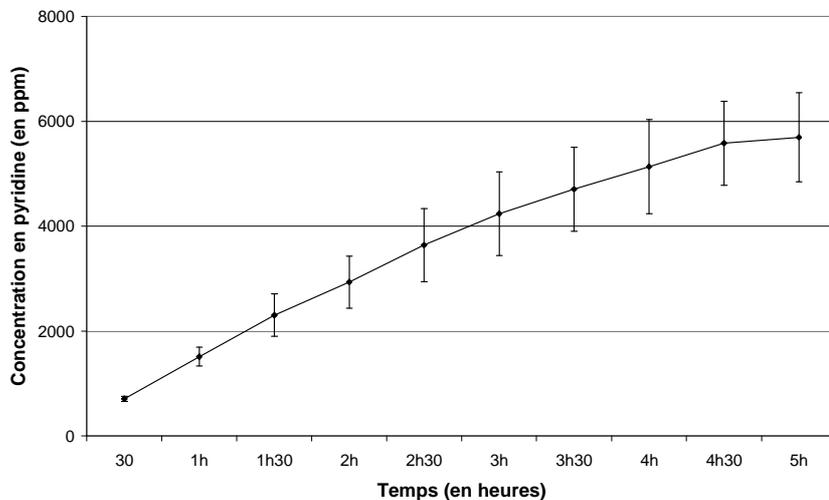
L'analyse chromatographique indique que pour une quantité d'acétone de 4 mL, la concentration en acétone dans la caisse d'exposition lors de l'expérimentation de courte durée (1 mois) est d'une moyenne de 7500 ppm (Figure 34).



**Figure 34 :** courbe représentant l'évolution de la concentration en acétone (mesurée en ppm) pour 4 mL d'acétone lors d'une exposition de 5h.

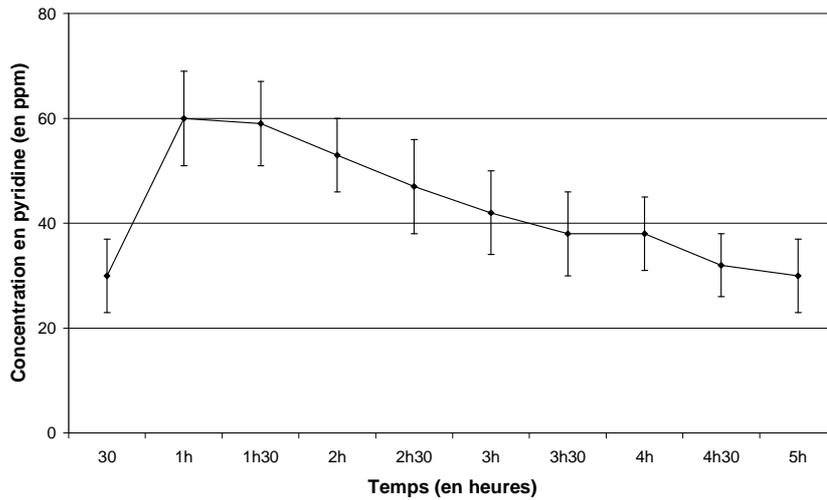
### b/ Pyridine

L'analyse chromatographique indique que la concentration en pyridine lors de l'expérimentation de courte durée (1 mois) est d'une moyenne de 3600 ppm (Figure 35) quand 1 mL de pyridine est introduit dans la caisse d'exposition.



**Figure 35 :** Courbe représentant l'évolution de la concentration en pyridine (mesurée en ppm) pour 1 mL de pyridine lors d'une exposition de 5h.

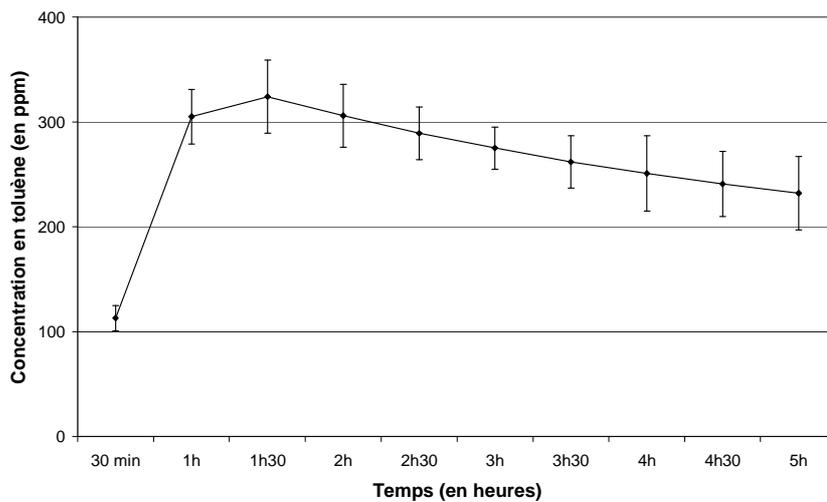
L'analyse chromatographique indique que pour 15 µL de pyridine, la concentration en pyridine lors de l'expérimentation de longue durée (5 mois) est d'une moyenne de 50 ppm (Figure 36) dans la caisse d'exposition.



**Figure 36:** Courbe représentant l'évolution de la concentration en pyridine (mesurée en ppm) pour 15 µL de pyridine lors d'une exposition de 5h.

### c/ Toluène

Différentes analyses chromatographiques ont révélé que 150 µL de toluène correspondaient à une concentration moyenne de 260 ppm (Figure 37).



**Figure 37:** Courbe représentant l'évolution de la concentration en toluène (mesurée en ppm) pour 150 µL de toluène lors d'une exposition de 5h.

### d/ CO<sub>2</sub>

La concentration en CO<sub>2</sub> n'est pas mesurée par chromatographie, puisque les souris sont exposées dans un incubateur où la concentration est réglée. Lors des expositions de courte durée et de longue durée au CO<sub>2</sub>, la concentration est de 3% (voir paragraphe 3-1b).

### 2-3- Expositions de courte durée

Les animaux sont mis soit en présence d'1 mL de pyridine (soit 3600 ppm) ou de 4 mL d'acétone (soit 7500 ppm), ou de 3 % de CO<sub>2</sub>. Ces expositions à différents polluants ont lieu 5 heures par jour et 5 jours par semaine pendant un mois.

Pour ces trois expérimentations, une période post exposition d'un mois suit la période d'exposition aux polluants, où les animaux ne sont plus exposés mais où les tests comportementaux et histologiques sont réalisés. Lors de ce mois sans exposition, les souris sont maintenues à l'animalerie dans des conditions standard de température et d'humidité. La figure 38 présente un récapitulatif des paramètres d'exposition de courte durée.

Polluant	Quantité	Concentration moyenne	Conditions d'exposition	Durée d'exposition	Durée de post exposition
Pyridine	1 mL	3600 ppm	5h/j et 5j/sem	1 mois	1 mois
Acétone	4 mL	7500 ppm			
CO <sub>2</sub>	-	3%			

**Figure 38 :** Récapitulatif des conditions d'exposition sur une courte durée.

### 2-4- Expositions de longue durée

Les expositions des expérimentations longues durées portent sur deux solvants: la pyridine et le toluène, et sur un gaz atmosphérique : le CO<sub>2</sub>. Les quantités de polluant sont faibles : 15 microlitres de pyridine (soit 50 ppm), et 150 µL de toluène (soit 260 ppm). L'exposition à la pyridine et au toluène a lieu 5 heures par jour et 5 jours par semaine pendant 5 mois. L'exposition au CO<sub>2</sub> a lieu 12 heures par jour et 5 jours par semaine pendant 1 mois. La figure 39 présente les conditions des trois manipulations réalisées en exposition longue durée.

Polluant	Quantité	Concentration moyenne	Conditions d'exposition	Durée d'exposition	Durée de post exposition
Pyridine	15 µL	50 ppm	5 h/j 5j/sem	5 mois	-
Toluène	150 µL	260 ppm			
CO <sub>2</sub>	-	3%	12h/j 5j/sem	1 mois	1 mois

**Figure 39 :** Récapitulatif des conditions d'exposition sur une longue durée.

### III-Protocole d'exposition

#### 3-1- Expositions de courte durée

##### a/ Exposition à des solvants

Les animaux sont placés dans une enceinte formée de panneau de mélaminé (Figure 40), hermétiquement fermée. Les dimensions des caisses d'exposition sont les suivantes : 80 cm de longueur, 42 cm de largeur et 41 cm de profondeur, soit un volume de 0,13 cm<sup>3</sup>. Le solvant est déposé directement sur un coton dans un flacon en verre. Le flacon en verre est ensuite installé sur le fond de la caisse. Deux tuyaux en plastique de 1 m de longueur et 1 cm de diamètre sortant de part et d'autre de l'enceinte permettent un renouvellement passif de l'air.



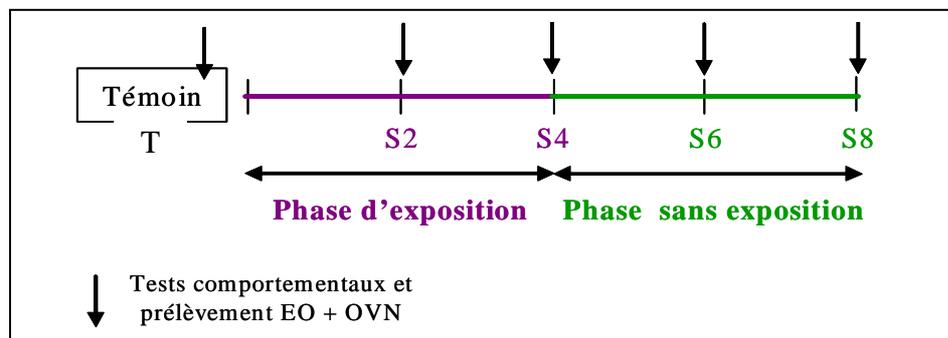
**Figure 40:** A gauche : enceinte d'exposition ; à droite : installation des cages à l'intérieur de l'enceinte lors des expositions.

Lors d'une première expérimentation, vingt souris sont exposées à l'acétone. 4 mL de ce solvant sont placés sur du coton dans un flacon en verre installé dans la caisse d'exposition.

Dans une deuxième expérimentation, vingt autres souris sont exposées la pyridine (quantité utilisée : 1 mL, suivant le même protocole que pour l'acétone).

Des tests comportementaux (voir paragraphe BI) sont réalisés avant le début de l'expérimentation (tests témoins T). Ensuite, les tests comportementaux sont réalisés toutes les deux semaines (le lundi matin de 8h à 10h30). En parallèle, deux souris sont sacrifiées afin de prélever l'épithélium olfactif et l'organe voméronasal. Des mesures histologiques et immunologiques sont alors effectuées sur ces tissus (voir parties C et D). La phase

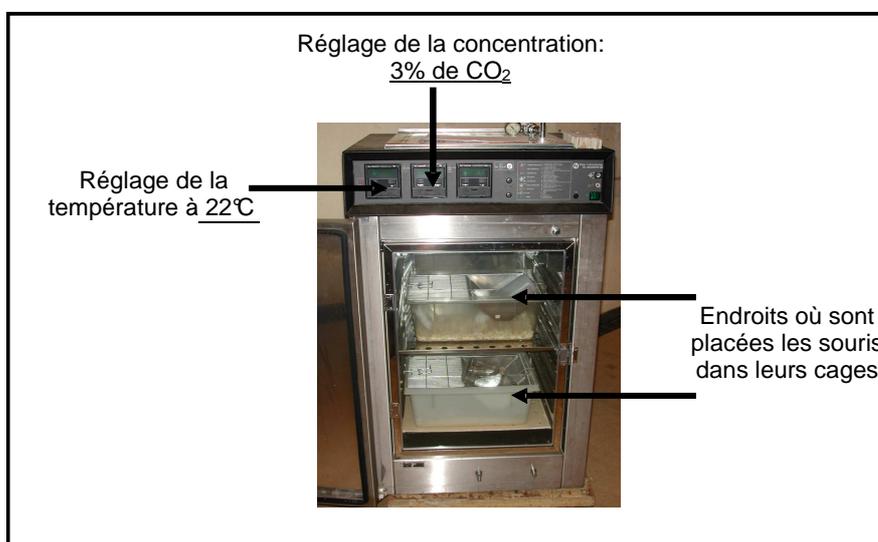
d'exposition au polluant est indiquée par les semaines 2 et 4, soit S2 et S4. La phase où les souris ne sont plus exposées au polluant correspond aux semaines 6 et 8, soit S6 et S8. La figure 41 décrit schématiquement l'expérimentation de courte durée menée sur deux mois.



**Figure 41:** Description du déroulement de l'expérimentation sur 2 mois

### b/ Exposition au CO<sub>2</sub>

Vingt souris sont placées 5 heures/jour et 5 jours/semaine pendant 4 semaines dans un incubateur (Figure 42) auquel est branché une bouteille de CO<sub>2</sub>. La température à l'intérieur de l'incubateur est de 22°C ± 2°C. La concentration en est réglée à 3%.



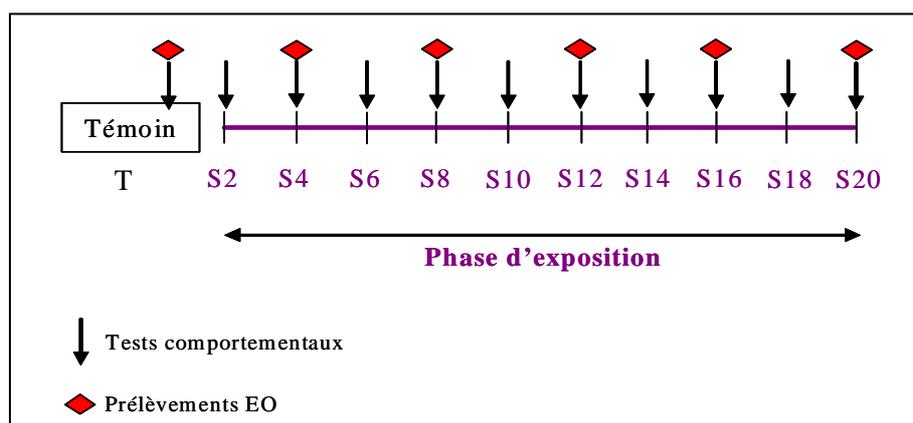
**Figure 42:** Incubateur à CO<sub>2</sub> où les souris sont placées lors de l'exposition.

Des tests comportementaux et des évaluations histologiques sont réalisées avant le début de l'expérimentation (témoin : T). Durant la phase d'exposition au CO<sub>2</sub> (S2 et S4) et durant la phase où les souris ne sont plus exposées (S6 et S8), des tests comportementaux sont effectués (voir partie BII). Parallèlement, deux souris sont sacrifiées afin de prélever l'épithélium olfactif et l'organe voméronasal.

### 3-2- Expositions de longue durée

#### a/ Expositions à des solvants

Les expositions de longue durée sont menées avec 15 µL de pyridine dans une première expérimentation, soit avec 150 µL de toluène dans une deuxième expérimentation. Les animaux sont placés dans des caisses d'exposition comme précédemment décrites dans les expositions de courte durée. Vingt souris sont exposées 5 heures/jour et 5 jours/ semaine pendant vingt semaines. Des tests comportementaux et des évaluations histologiques sont réalisés avant le début de l'expérimentation (semaine témoin : T). Ensuite, les tests comportementaux sont effectués toutes les deux semaines (S2, S4, S6, S8, S10, S12, S14, S16, S18, S20). Toutes les quatre semaines (S4, S8, S12, S16, S20), deux souris sont sacrifiées dans le but de prélever l'épithélium olfactif. La figure 43 décrit schématiquement l'expérimentation de longue durée menée sur vingt semaines.



**Figure 43 :** Description du déroulement de l'expérimentation, menée sur 20 semaines (EO : épithélium olfactif).

#### b/ Exposition au CO<sub>2</sub>

Vingt souris sont placées 12 heures/jour et 5 jours /semaine pendant 4 semaines dans un incubateur (voir description du protocole d'exposition paragraphe 3-1-b). Des tests comportementaux ainsi que des mesures histologiques sont conduites avant (T), pendant (S2/S4) et après (S6/S8) l'exposition au CO<sub>2</sub> (voir paragraphe 3-1b, figure 42).

## **B : Tests d'évaluation du comportement d'approche/évitement des souris vis-à-vis de sources odorantes.**

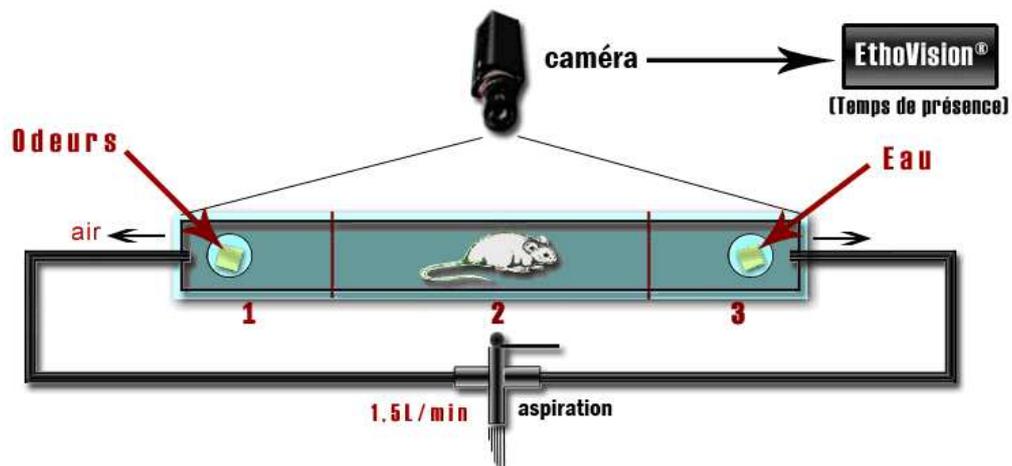
### **I- Tests comportementaux réalisés avec les solvants**

Ces tests sont des tests d'occupation zonale par rapport à une source odorante menés sur un groupe de 10 souris. Ils sont réalisés à l'aide d'un corridor (Figure 44) mesurant 60 centimètres de longueur, 7 centimètres de largeur et 7 centimètres de hauteur. Cette structure est une adaptation du labyrinthe en Y, qui est composé de 3 compartiments et permet de mesurer le comportement d'approche/évitement de l'animal. Ce corridor est divisé en 3 zones virtuelles définies par un logiciel (Figure 45) : deux zones de même dimension aux extrémités, et une zone au centre du corridor, où aucune odeur n'est présente. Cette absence de molécules odorantes dans la zone centrale du corridor a été vérifiée par des analyses en chromatographie gazeuse. En effet, l'installation est soumise à un flux d'air hydraulique (débit : 1,5 L/min) afin de prévenir une dispersion des molécules odorantes dans l'ensemble du corridor. A chaque extrémité (zones 1 et 3) est placée une coupelle contenant une substance déposée sur un carré de papier-filtre. Les substances testées sont l'eau (substance contrôle), le butanol dilué à 10%, l'urine de souris mâle OF-1 - prélevée juste avant le début des tests comportementaux, en maintenant l'animal par le cou et en appuyant doucement sur sa vessie (Monahan *et al.*, 1993) - et la substance d'exposition, soit le toluène, l'acétone, ou la pyridine, diluée à 10% dans de l'eau distillée. Les substances choisies diffèrent par leurs effets sur le comportement de l'animal : le butanol est utilisé comme odeur aversive (Ducray *et al.*, 2002) ; l'urine de souris mâle constitue une odeur intraspécifique attractive pour les souris femelles (Baum et Keverne, 2002 ; Martínez-Ricós *et al.*, 2008) ; enfin, le comportement d'approche/évitement des souris est testé pour les substances d'exposition. La quantité de produit déposée sur les papiers-filtres, conformément à d'autres études utilisant ses substances, est de 30 µL d'urine de souris mâle (Keller *et al.*, 2006) et de 200 µL pour toutes les autres substances diluées à 10% (Jacquot *et al.*, 2006). Le corridor est recouvert d'une plaque de verre pour éviter la dispersion des odeurs et empêcher les souris de s'échapper.

Entre chaque passage de souris, le dispositif expérimental est nettoyé à l'alcool à 70° puis séché. Des analyses par chromatographie en phase gazeuse ont permis de montrer

l'efficacité de ce nettoyage à l'alcool à 70° révélant l'absence de molécules chimiques suite à ce nettoyage.

Le papier-filtre des coupelles est changé et l'ordre des coupelles est inversé afin de limiter les phénomènes d'apprentissage et car les souris peuvent présenter une latéralisation préférentielle (Signore *et al.*, 1991). Le passage des souris dans ce dispositif est de 3 minutes, pendant lesquelles un système automatisé d'acquisition des données, nommé Ethovision, enregistre les paramètres choisis. Une caméra située au dessus du corridor enregistre les mouvements de la souris. Les données sont ensuite transmises à l'ordinateur et au logiciel Ethovision. Ce logiciel permet de quantifier divers paramètres comportementaux observés durant les 3 minutes de test, tels que la fréquence d'entrée dans les différentes zones du corridor ou la distance parcourue par l'animal durant le test. Dans les études menées lors de cette thèse, le paramètre retenu en raison de sa pertinence pour les mesures de comportement d'approche/évitement (Jacquot *et al.*, 2006) est le temps passé dans chaque zone du corridor.

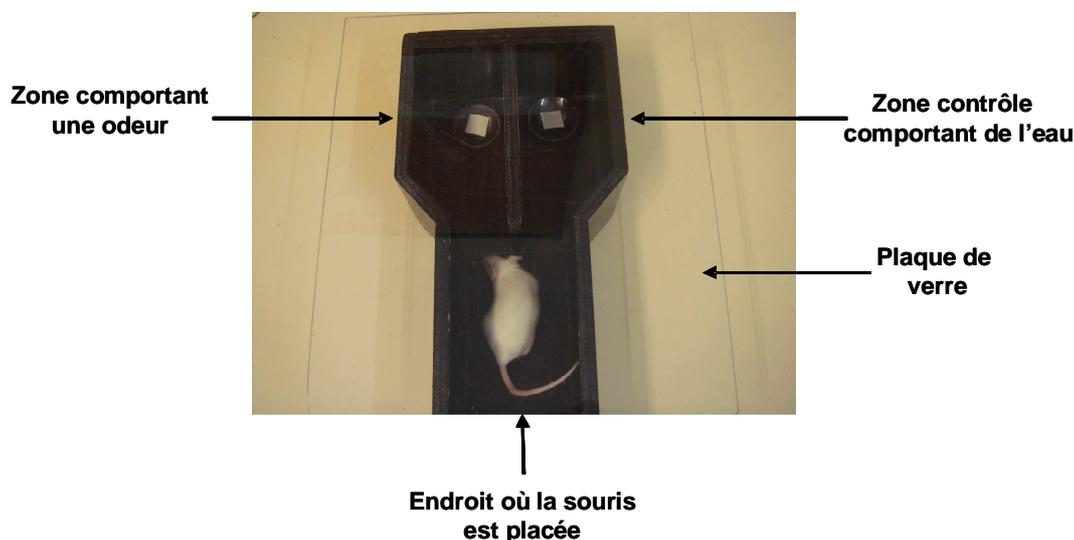


**Figure 44:** *haut* : Schématisation du dispositif expérimental pour l'étude comportementale de la sensibilité olfactive des souris ; *bas* : Photo du corridor utilisé lors des tests comportementaux.

## II- Tests comportementaux réalisés avec le CO<sub>2</sub>

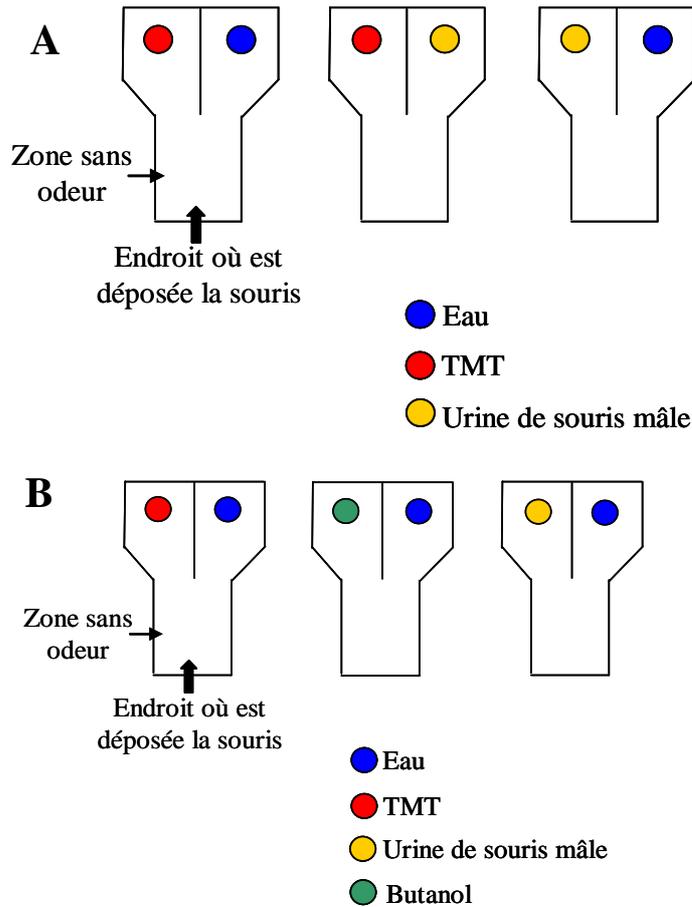
Les tests comportementaux évaluant le comportement d'approche/évitement d'un groupe de 10 souris suite à l'exposition au CO<sub>2</sub> sont réalisés à l'aide de labyrinthe en Y (Figure 45). Le labyrinthe en Y est formé de 3 zones de volume identique. Dans deux de ces zones sont placées des coupelles contenant un morceau de papier-filtre sur lequel est déposé une substance. Les substances testées sont l'eau (200 µL), le butanol dilué à 10% (200 µL), le 2,4,5-triméthylthiazoline pur 10 µL ; le triméthylthiazoline est une substance synthétique issue des fèces de renards roux, utilisé dans cette expérimentation pour mesurer le comportement d'approche/évitement des souris vis-à-vis d'un indice de prédateur suite à l'exposition à une substance volatile toxique) et l'urine de souris mâle (30 µL). Lors de l'enregistrement des mesures comportementales, une plaque de verre est placée sur le labyrinthe afin d'éviter une dispersion des odeurs et d'empêcher la souris de sortir du dispositif comportemental.

Entre chaque passage, le labyrinthe est nettoyé à l'alcool à 70°C puis séché. Les coupelles sont nettoyées et le papier-filtre contenant l'odeur est remplacé. Les coupelles sont ensuite placées aléatoirement dans la zone droite ou la zone gauche du labyrinthe. Le système Ethovision enregistre le temps passé par l'animal dans les 3 zones du labyrinthe.



**Figure 45:** Labyrinthe en Y utilisé pour les mesures comportementales lors de l'expérimentation avec le CO<sub>2</sub>.

La figure 46 indique les tests réalisés lors des expérimentations menées avec l'exposition au CO<sub>2</sub> pendant 5 heures par jour ou pendant 12 heures par jours pendant 5 jours par semaine et durant un mois.



**Figure 46:** Schématisation des tests comportementaux réalisés lors de l'exposition au CO<sub>2</sub> pendant **A** : 5 heures/ jour et 5 jours/semaine et **B** : 12 heures/jour et 5 jours/semaine. TMT : triméthylthiazoline

### III- Tests contrôles

Avant de débiter les différentes expérimentations, des tests sont réalisés au préalable sur un groupe contrôle. Ce groupe contrôle est composé de 10 souris femelles de type OF-1 âgées de 3 mois au début de l'expérimentation. Le protocole d'exposition est le même que celui des autres expérimentations. Les souris sont placées 5 heures par jour et 5 jours par semaine dans une enceinte hermétiquement fermée (voir Chapitre II) où le polluant placé sur un coton dans un récipient en verre est remplacé par 2 mL d'eau. Toutes les deux semaines, des tests comportementaux évaluant le comportement d'approche/évitement des souris sont effectués à l'aide de corridor (voir partie 1-1 de ce chapitre pour les conditions expérimentales). Dans l'une des extrémités du corridor est placée une coupelle en verre contenant un morceau de papier-filtre sur lequel est déposé soit 30 µL d'urine de souris mâle, soit 200 µL de pyridine, de toluène, d'acétone, de butanol (ces substances étant diluées à 10% comme dans les autres expérimentations), ou soit 10 µL de triméthylthiazoline pur. Dans l'autre extrémité du corridor est placée une coupelle en verre contenant un morceau de papier-filtre sur lequel est déposé 200 µL d'eau. Le temps passé par les souris dans chaque zone du corridor est alors enregistré par le système Ethovision.

Des tests statistiques d'analyse de variance (ANOVA) à mesures répétées sont ensuite réalisées sur les données recueillies, le seuil de significativité étant fixé à 5% (soit 0,05). Les résultats de cette étude menée sur un groupe contrôle, présentés dans la figure 47, ne montrent pas de différence significative pour les odeurs testées en fonction des semaines d'expérimentation. Les valeurs de  $F$  et de  $p$  sont indiquées, ces dernières étant pour chaque odeur supérieures au seuil de significativité de 0,05. Ces résultats montrent donc que le temps passé par les souris dans les zones contenant le toluène (soit en moyenne 67,66 secondes), la pyridine (soit en moyenne 34,12 secondes) ou l'acétone (soit en moyenne 92,58 secondes) ne varie pas significativement au cours de l'expérimentation. De plus, il n'existe pas de variations significatives en fonction des semaines pour les autres odeurs testées en corridors, soit l'urine de souris mâle (en moyenne 91,06 secondes), le triméthylthiazoline (en moyenne 14,56 secondes) et le butanol (en moyenne 63,84 secondes). Ces résultats révèlent qu'en dehors de toute exposition, le comportement d'approche/évitement des souris pour toutes les odeurs testées lors des évaluations comportementales ne varie pas au cours des semaines. Les données mesurées lors des expérimentations se référeront donc aux données du témoin (T), c'est-à-dire mesurées avant le début de l'exposition.

	<b>Toluène</b>	<b>Pyridine</b>	<b>Acétone</b>	<b>Urine</b>	<b>TMT</b>	<b>Butanol</b>
<b>Valeur de F(4,30)</b>	2,41	1,40	1,62	0,17	0,40	1,03
<b>Valeur de p</b>	0,08	0,27	0,20	0,95	0,81	0,41
<b>Moyenne</b>	67,66	34,12	92,58	91,06	14,56	63,84
<b>Ecart-type</b>	7,24	3,53	7,48	8,94	1,84	4,41
<b>Erreur standard</b>	1,62	0,79	1,67	2,00	0,41	0,98

**Figure 47 :** Résultats des tests menés avec le groupe contrôle. Valeurs de F, de p, moyenne et écart-type du temps passé dans les compartiments contenant les odeurs.

#### **IV- Traitement statistique des données**

Les résultats comportementaux sont traités grâce au logiciel Statview 5.0 par analyse de variance (ANOVA) à mesures répétées. Le seuil de significativité est déterminé à 5% ( $\alpha < 0,05$ ). Des tests *post hoc* de PLSD de Fisher sont réalisés pour les résultats significatifs. Les résultats sont présentés sous forme de courbe. Les barres d'erreurs standards sont indiquées pour chaque mesure. Les courbes sont suivies des résultats *post hoc* lors que l'ANOVA est significative

## **C : Mesures histologiques sur l'épithélium olfactif**

Les différentes étapes allant du prélèvement du tissu jusqu'à la mise des coupes sur lame ont pour finalité l'obtention de coupes fines observables au microscope. L'ensemble de ces étapes, qui seront détaillées dans une première partie, comprend : le prélèvement de l'épithélium olfactif, la fixation, l'inclusion, la coupe, le montage des lames, la coloration et le montage, et finalement l'observation des coupes. Il sera alors possible de mesurer certains paramètres comme l'épaisseur de l'épithélium olfactif et la densité de cellules présentes dans l'épithélium olfactif. Dans une seconde partie seront présentés les résultats de chaque expérimentation.

### **I- Prélèvement de l'épithélium olfactif**

Toutes les deux semaines, deux animaux sont tués par une injection intrapéritonéale de chloral 3M, puis décapitées à l'aide d'une guillotine. La dissection, qui suit immédiatement la mort de l'animal, consiste à prélever l'épithélium olfactif dans sa totalité, de sa partie postérieure (près des bulbes olfactifs) à sa partie antérieure (juste avant l'épithélium respiratoire).

#### **1-1- Fixation**

La fixation des cellules du tissu se fait par immersion de l'épithélium olfactif dans du paraformaldéhyde à 4 % pendant 12 heures. Cette fixation a pour but de protéger les tissus prélevés de toute hydrolyse due à la libération d'enzymes contenues dans les lysosomes cellulaires. Les tissus étant fixés, deux rinçages dans du tampon phosphate salin de 30 minutes chacun sont effectués. Les tissus sont ensuite placés dans du décalcifiant osseux (Labo-Moderne, France) pendant 12 heures avant de subir à nouveau deux rinçages dans du tampon phosphate salin pendant 30 minutes. Les tissus sont alors placés dans un bain d'alcool à 70°C, et l'étape d'inclusion en paraffine peut alors débuter.

#### **1-2- Inclusion en paraffine**

La paraffine n'étant pas miscible à l'eau, les tissus fixés devront être déshydratés. Ils subissent alors des bains successifs de 45 minutes d'alcool à 95° puis d'alcool à 100° (deux

fois). Comme la paraffine n'est pas miscible à l'alcool éthylique, celui-là sera remplacé par un liquide intermédiaire avant inclusion. Deux bains successifs de 45 minutes de butanol seront alors réalisés. Afin d'éliminer totalement le solvant intermédiaire et de réaliser une imprégnation dans la paraffine, les tissus seront placés dans trois bains successifs de paraffine d'une durée d'une heure chacun. Lorsque cette imprégnation est terminée, les tissus sont mis en bloc.

### **1-3- Coupe des blocs**

La coupe des blocs se fait à l'aide d'un microtome de type Minot. Le bloc de paraffine est taillé grâce à un scalpel afin d'éliminer l'excès de paraffine qui entoure l'épithélium olfactif. Le bloc taillé est ensuite fixé sur un porte-objet métallique préalablement chauffé à la flamme pour obtenir une bonne adhérence du bloc de paraffine. Les coupes réalisées ont une épaisseur de 10 µm.

### **1-4- Montage sur lame**

Le montage des coupes a lieu sur des lames préalablement gélatinées. Sur ces lames sont déposées des gouttes d'eau sur lesquelles sont placées les coupes. Les lames sont ensuite posées sur une plaque chauffante afin d'éliminer l'eau et de faire adhérer les coupes à la lame. Pour que l'eau soit entièrement évaporée, les lames sont installées dans une étuve à 37°C pendant 24 heures.

### **1-5- Coloration et montage pour conservation**

La coloration à l'hématoxyline de Harris (Sigma-Aldrich, France) a pour but de colorer les noyaux cellulaires en brun foncé. Elle est constituée de trois étapes.

étape 1 : Déparaffinage / Réhydratation.

Pour permettre la coloration, les lames sont déparaffinées et réhydratées en les plongeant dans des bains successifs de 3 minutes chacun de xylène (trois fois), d'alcool à 100° (deux fois), d'alcool à 95°, d'alcool à 70° et d'eau distillée.

### étape 2 : Coloration

Les lames sont ensuite placées dans de l'hématoxyline de Harris (Sigma Aldrich) pendant 2 minutes, permettant ainsi la coloration des noyaux. Les lames sont alors rincées sous un filet d'eau courante pendant 3 à 4 minutes, puis rincées à l'eau distillées pendant 3 minutes.

### étape 3 : Déshydratation / Montage

Les mêmes bains qu'à l'étape 1 sont réalisés, mais dans le sens inverse, c'est-à-dire de l'alcool à 70°C vers le xylène. Les lames sont laissées à l'air libre pour leur permettre de sécher, puis le montage entre lame et lamelle par histolaque (Labo-Moderne, France) est réalisé.

## **1-6- Observation des coupes**

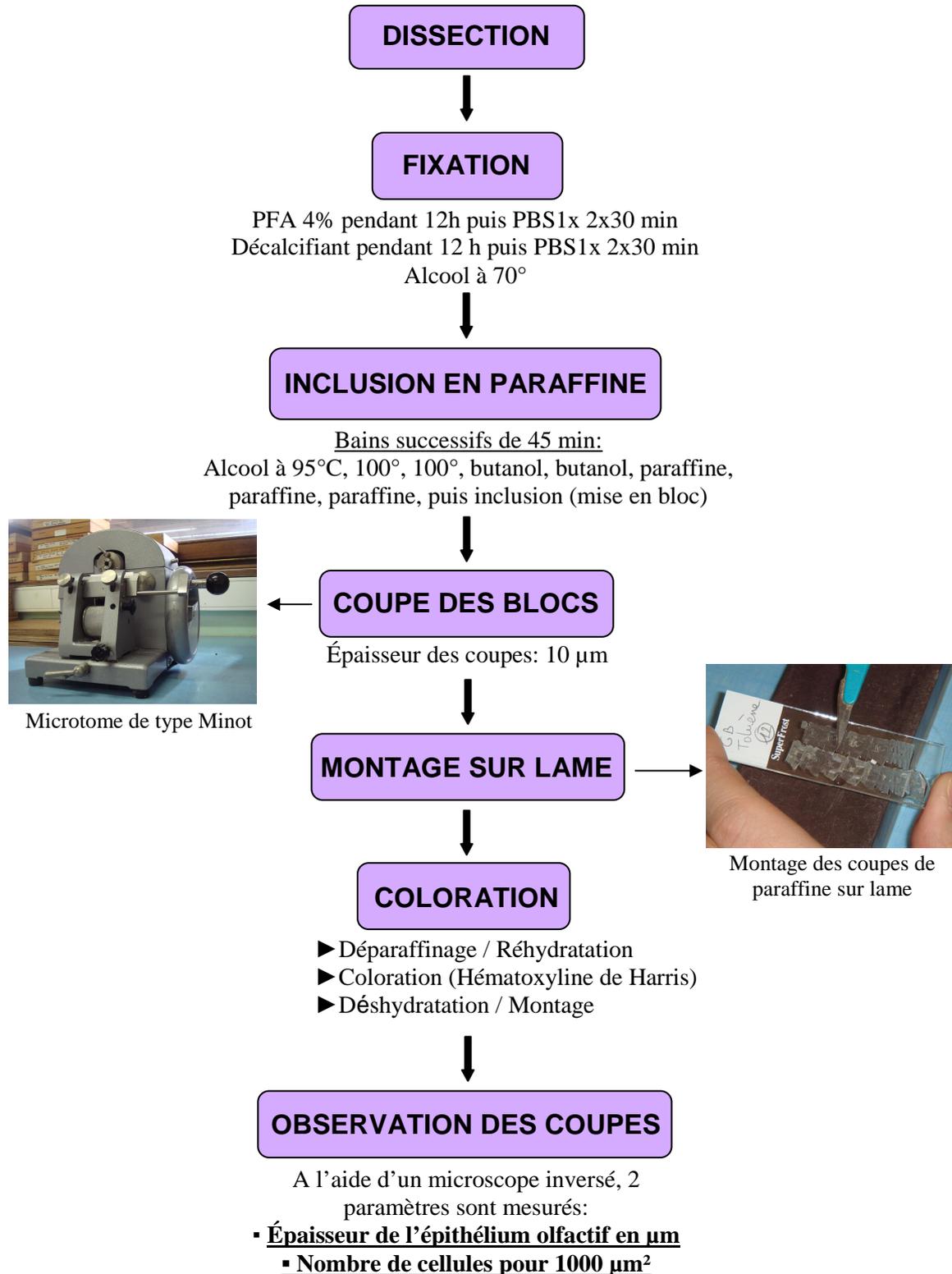
L'observation des lames colorées se fait à l'aide d'un microscope inversé. Les mesures sont réalisées à l'aide de Lucia, un logiciel d'acquisition et d'archivage des images, permettant la réalisation de mesures automatiques de différents éléments de l'image. Deux paramètres sont retenus : l'épaisseur de l'épithélium (en  $\mu\text{m}$ ) et le nombre de cellules (pour une surface de  $1000 \mu\text{m}^2$ ). Neuf lames par zone de l'épithélium olfactif (antérieure, médiane, et postérieure) sont choisies de façon systématique. Sur chaque lame, une mesure est réalisée. Au total, 27 mesures correspondent à un individu.

## **II- Traitement statistique des données**

Les données recueillies sont traitées par le logiciel Statview. Des analyses de variance (ANOVA) sont réalisées. Si les ANOVA révèlent un effet semaine significatif (mesures réalisées toutes les deux semaines lors des expositions de courte durée et toutes les quatre semaines lors des expositions de longue durée), des tests *post hoc* PLSD de Fisher sont alors effectués. Les résultats sont présentés sous forme de courbes à deux axes où est indiquée l'évolution du nombre de cellules et de l'épaisseur de l'épithélium olfactif avant (T), pendant (S2/S4 ou de S4 à S20) et après (S6/S8) l'exposition à un polluant. Les barres d'erreur standard sont indiquées pour chaque mesure. Les courbes sont suivies des résultats *post hoc* lors que l'ANOVA est significative

### III- Récapitulatif du protocole d'histologie

La figure 48 récapitule les différentes étapes du protocole des expérimentations en histologie.



**Figure 48 :** Récapitulatif du protocole de mesures histologiques  
PFA : Paraformaldéhyde ; PBS1x : tampon phosphate salin

## D : Mesures immunohistochimiques sur l'épithélium olfactif

### I- Protocole

Les mesures immunohistochimiques sont réalisées par marquage immunofluorescent, d'une part à l'aide du PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen) pour quantifier les cellules en division, et d'autre part l'OMP (Olfactory Marker Protein) pour marquer les cellules neuronales matures (Figure 49).

Les coupes sur lames paraffinées sont déparaffinées par immersion dans le xylène pendant 10 minutes. Elles sont ensuite réhydratées dans 2 bains successifs d'alcool à 90° et d'alcool à 70° pendant 5 minutes. Les lames sont rincées dans deux bains de tampon phosphate salin pendant 1 minute, puis perméabilisées par immersion dans deux bains de triton X100 de 15 minutes chacun. Suit un rinçage dans 2 bains de tampon phosphate salin pendant 1 minute. Après séchage des lames au papier absorbant, les coupes sont entourées avec du Dakopen, et les sites non spécifiques sont bloqués par de l'albumine de sérum bovin pendant 10 minutes, puis par du vector mouse blocking reagent pendant 30 minutes. Les anticorps primaires sont ensuite placés : OMP 1/200 en incubés pendant 24 heures à 4°C sous atmosphère humide. Elles sont ensuite rincées par immersion dans 5 bains successifs de tampon phosphate salin de 3 minutes chacun. Les anticorps secondaires sont alors placés : et incubés pendant 2 heures à température ambiante. Les lames sont ensuite rincées par immersion dans 5 bains successifs de tampon phosphate salin de 3 minutes chacun et montées entre lame et lamelle. Elles sont conservées à l'obscurité et à 4°C.

Anticorps primaire	Origine	Fournisseur	Dilution
Anti-OMP	Chèvre	Wako	1/200
Anti-PCNA	Souris	Sigma-Aldrich	1/50
Anticorps secondaire			
Anti-Chèvre	Lapin	Alexa-Fluor 488 (FITC)	1/1000
Anti-Souris	Porc	Alexa-Fluor 555 (TRITC)	1/1000

**Figure 49 :** Anticorps utilisés lors du double marquage immunohistochimique. Les longueurs d'onde (indiquées en nanomètres) sont présentées à la suite du fournisseur.

FITC : Fluoresceine Iso Thio Cyanate

TRITC : Tetramethyl Rhodamine Iso Thio Cyanate

## **II- Observation des lames**

Neuf lames sont choisies de façon systématique de la partie postérieure à la partie antérieure de l'épithélium olfactif. Sur chaque lame, une mesure est réalisée. Au total, neuf mesures sont réalisées par individu et par semaine. Les lames sont observées en microscopie électronique à fluorescence au grossissement x40.

## **III- Traitement statistique des données**

Les résultats concernant les marquages à l'OMP et au PCNA sont traités grâce au logiciel Statview 5.0 par analyse de variance (ANOVA). Le seuil de significativité est déterminé à 5% ( $\alpha < 0,05$ ). Des tests *post hoc* de PLSD de Fisher sont réalisés pour les résultats significatifs. Les résultats sont représentés sous forme de courbes à deux axes où est présentée l'évolution du nombre de cellules OMP-positives (pour une surface de 1000  $\mu\text{m}^2$ ) et de cellules PCNA-positives (pour une longueur de 500  $\mu\text{m}$ ) avant (T) au cours (S2/S4) et après l'exposition (S6/S8) pour les expositions de courte durée, et au cours des expositions de longue durée (S4 à S20). Les barres d'erreurs standards sont notées pour chaque mesure. Les courbes sont suivies des résultats *post hoc* lorsque l'ANOVA est significative.

## **E : Mesures histologiques sur l'organe voméronasal**

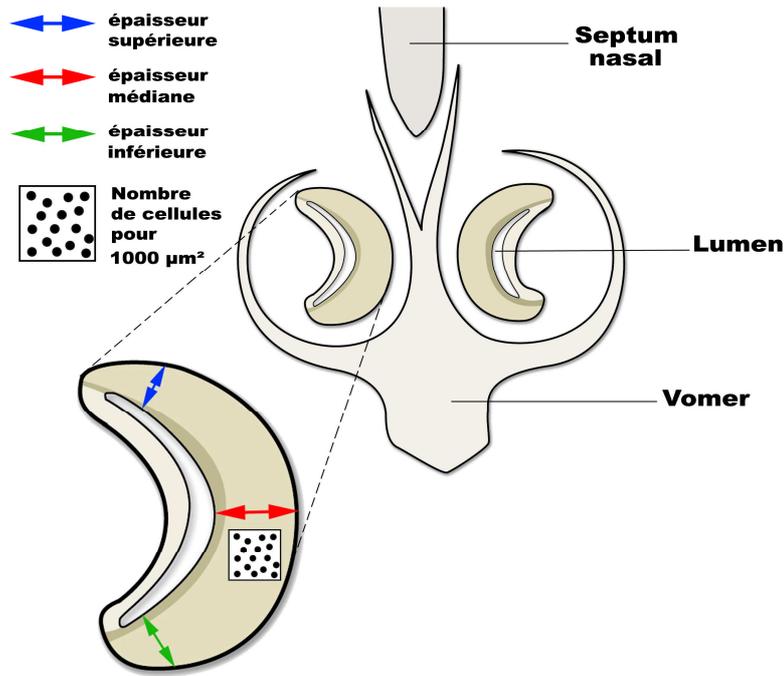
### **I-Protocole**

Le protocole d'analyse de l'organe voméronasal est le même que la partie matériel et méthodes du chapitre IV : Mesures histologiques de l'épithélium olfactif.

Il existe cependant quelques différences. Il faut noter que l'organe voméronasal est prélevé avec sa capsule cartilagineuse, puisque l'extraction de l'organe voméronasal de sa capsule serait trop destructrice. Les coupes réalisées à l'aide du microtome de type Minot ont une épaisseur de 15  $\mu\text{m}$ . De plus, en raison de la présence de la capsule cartilagineuse, l'organe voméronasal, après un bain de paraformaldéhyde à 4%, est placé 24 heures dans le décalcifiant osseux.

### **II- Mesures morphométriques**

Afin d'évaluer les dommages potentiels subits par l'épithélium de l'organe voméronasal, des mesures morphométriques sont réalisées. Trois lames comportant chacune 6 coupes d'organe voméronasal sont choisies parmi toutes les lames réalisées pour un organe voméronasal donné. Les lames sont sélectionnées de façon à représenter l'organe voméronasal dans sa totalité, c'est-à-dire de sa partie antérieure à sa partie postérieure. Pour chaque lame, 3 coupes choisies aléatoirement sont analysées. Les mesures réalisées sur l'organe voméronasal à l'aide d'un microscope inversé sont les suivantes : l'épaisseur supérieure, l'épaisseur médiane, l'épaisseur inférieure, et la densité cellulaire soit le nombre de cellules (dont les noyaux sont colorés à l'hématoxyline de Harris) de l'épaisseur médiane pour 1000  $\mu\text{m}^2$  (Figure 50). En effet, en fonction de l'emplacement, les épaisseurs de l'épithélium de l'organe voméronasal varient, c'est pourquoi l'épaisseur est mesurée au niveau de trois zones. L'épaisseur est mesurée depuis la lame basale jusqu'à l'apex de l'épithélium. De plus, le nombre de cellules n'est pas évalué aux extrémités de l'épithélium de l'organe voméronasal (parties supérieure et inférieure), puisque qu'elles correspondent à des zones de prolifération cellulaire, et que l'objectif principal de cette étude est de montrer l'effet de l'exposition de polluants atmosphériques sur les cellules matures de l'épithélium de l'organe voméronasal.



**Figure 50:** Coupe frontale schématique présentant les mesures réalisées sur l'organe voméronasal. Les flèches indiquent les mesures concernant l'épaisseur de l'épithélium de l'organe voméronasal. Le carré montre le comptage des cellules dans l'épithélium médian de l'organe voméronasal.

### III- Traitement statistique des données

Les données histologiques (épaisseur de l'épithélium dans trois zones et densité cellulaire dans la zone médiane) sont traitées par le logiciel Statview 5.0. Des ANOVA sont réalisés, suivies de tests *post hoc* PLSD de Fisher pour les résultats significatifs ( $\alpha < 0,005$ ). Pour chaque expérimentation, les résultats sont présentés sous forme de courbes. D'une part, trois courbes correspondent aux zones supérieure, médiane et inférieure de l'épithélium de l'organe voméronasal. D'autre part, une courbe représente l'évolution du nombre de cellules totales comptées au niveau de la zone médiane de l'épithélium. Les courbes sont suivies des résultats *post hoc* lorsque l'ANOVA est significative.

**Partie 2 : Effets de l'exposition sur une courte durée à des polluants sur le système olfactif principal de la souris : évaluations comportementales et histologiques.**

*Les résultats des mesures comportementales, histologiques et immunohistochimiques obtenues lors de l'expérimentation de courte durée à l'acétone font l'objet d'une publication sous presse (Buron et al., 2008, ANNEXE2).*

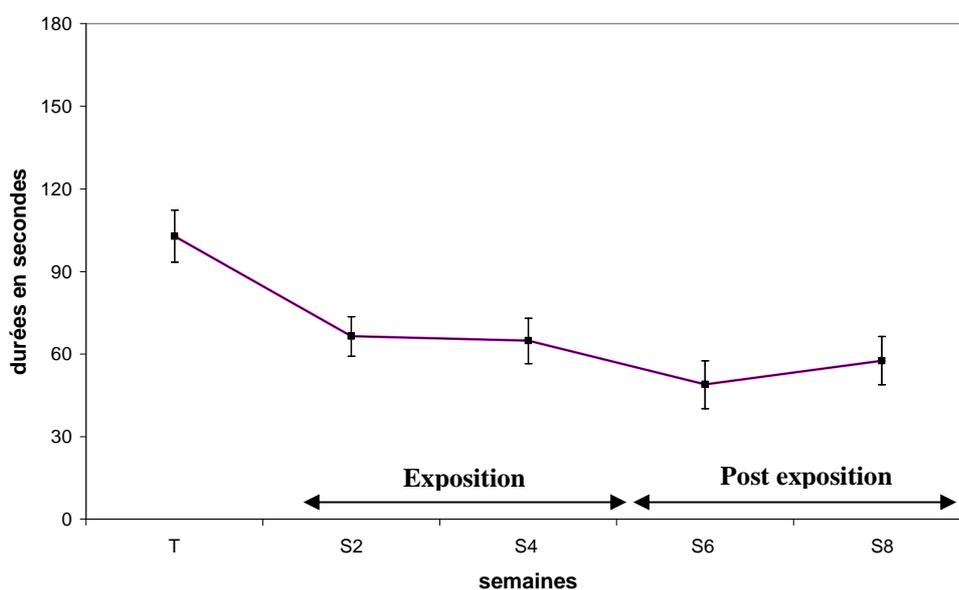
*Un article, regroupant une partie des résultats des expositions de courte et de longue durée à la pyridine est actuellement soumis (ANNEXE 3).*

## I- Evaluations comportementales

### 1-1- Exposition à l'acétone

#### a/ Test d'approche/évitement vis-à-vis de l'acétone (vs eau)

L'ANOVA concernant le test d'approche/évitement vis-à-vis de l'odeur d'acétone montre un effet semaine significatif [ $F(4,36)=6,182$  ;  $p=0,0002$ ]. Le temps passé par les souris dans la zone contenant l'acétone est significativement inférieur aux valeurs mesurées avant l'exposition (T) au cours de l'exposition (S2/S4) et lors de la période de post-exposition (S6/S8). En outre, aucune différence significative n'est mesurée pendant l'exposition (S2/S4) (Figure 51).



	S2	S4	S6	S8
T	0,0036	0,0033	<0,0001	0,0003
S2		ns	ns	ns
S4			ns	ns
S6				ns

**Figure 51:** *haut* : Courbe représentant le temps passé (en secondes) par les souris dans le compartiment contenant l'acétone ;

*gauche* : Tableau indiquant les différences significatives ou non significatives (ns) entre les temps passés dans le compartiment contenant l'acétone en fonction des semaines.

#### b/ Test d'approche/évitement vis-à-vis du butanol (vs eau)

L'ANOVA concernant le test d'approche/évitement vis-à-vis de l'odeur de butanol ne montre pas d'effet semaine significatif pour l'odeur de butanol [ $F(4,36)=1,228$  ;  $p=0,3061$ ]. Le temps passé par les souris dans la zone contenant le butanol varie de 50,4 à 66,3 secondes au cours de l'expérimentation

### **c/ Test d'approche/évitement vis-à-vis de l'urine (vs eau)**

L'ANOVA concernant le test d'approche/évitement vis-à-vis de l'odeur d'urine ne montre pas d'effet semaine significatif pour l'odeur d'urine [ $F(4,36)=0,783$  ;  $p=0,5392$ ]. Le temps passé par les souris dans la zone contenant l'urine de souris mâle varie de 92,4 à 106,6 secondes au cours de l'expérimentation.

### **d/ Résultats des évaluations comportementales avant, pendant et après l'exposition à l'acétone sur une courte durée.**

Avant l'exposition à l'acétone (T), les tests comportementaux ont révélé le caractère neutre de l'odeur de l'acétone, puisque les souris se répartissent de façon aléatoire dans la zone contenant l'acétone et dans la zone contenant l'eau. Les résultats des tests comportementaux lors de l'expérimentation à l'acétone révèlent que l'exposition à l'acétone a un impact sur le comportement des souris puisqu'une augmentation significative de l'évitement pour l'odeur d'acétone est mesurée pendant (S2/S4) et après (S6/S8) l'exposition. Cependant, elle ne modifie pas le comportement d'approche/évitement des souris vis-à-vis des odeurs de butanol et d'urine de souris mâle tant au cours de l'exposition (S2/S4) que lors de la période de post-exposition (S6/S8).

## 1-2- Exposition à la pyridine

### a/ Test d'approche/évitement vis-à-vis de la pyridine (vs eau)

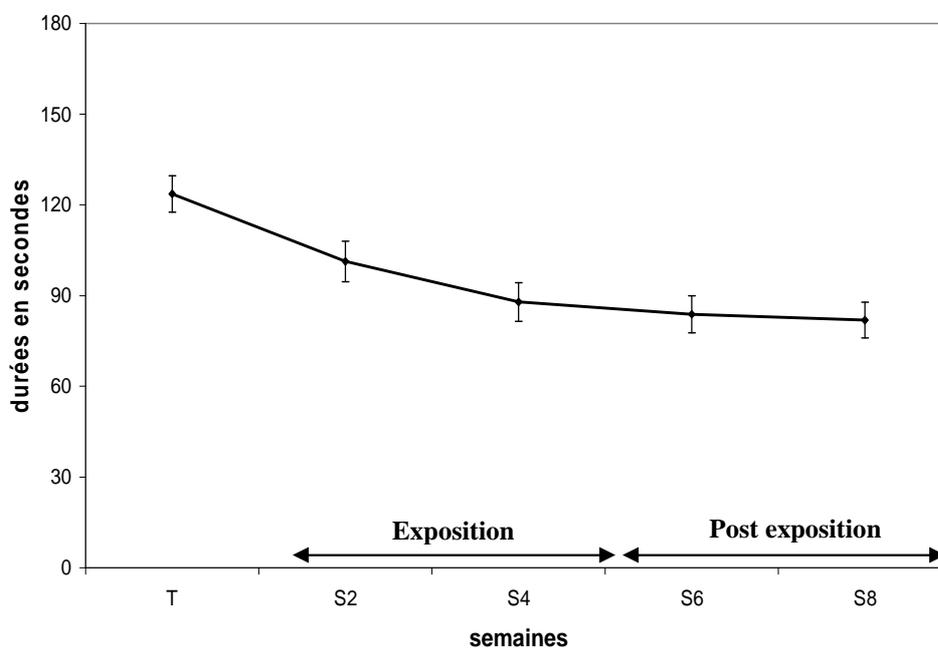
L'ANOVA concernant le test d'approche/évitement vis-à-vis de l'odeur de pyridine ne montre pas d'effet semaine significatif pour l'odeur de pyridine [ $F(4,36)=0,916$  ;  $p=0,4603$ ]. Le temps passé par les souris dans la zone contenant la pyridine varie de 44,2 à 60,8 secondes au cours de l'expérimentation.

### b/ Test d'approche/évitement vis-à-vis du butanol (vs eau)

L'ANOVA concernant le test d'approche/évitement vis-à-vis de l'odeur de butanol ne montre pas d'effet semaine significatif pour l'odeur de butanol [ $F(4,36)=0,911$  ;  $p=0,4614$ ]. Le temps passé par les souris dans la zone contenant le butanol varie de 55,9 à 65,1 secondes au cours de l'expérimentation

### c/ Test d'approche/évitement vis-à-vis de l'urine (vs eau)

L'ANOVA concernant le test d'approche/évitement vis-à-vis de l'odeur d'urine montre un effet semaine significatif pour l'odeur d'urine de souris mâle [ $F(4,36)=7,987$  ;  $p<0,0001$ ] (Figure 52).



	S2	S4	S6	S8
T	0,0135	<0,0001	<0,0001	<0,0001
S2		ns	ns	0,0327
S4			ns	ns
S6				ns

**Figure 52:** *haut* : Courbe représentant le temps passé (en secondes) par les souris dans le compartiment l'urine de souris mâle ;  
*gauche* : Tableau indiquant les différences significatives ou non significatives (ns) entre les temps passés dans le compartiment contenant l'urine en fonction des semaines.

Le temps passé par les souris dans la zone contenant l'urine de souris mâle est significativement inférieur aux valeurs mesurées avant l'exposition (T) au cours de l'exposition (S2/S4) et lors de la période de post-exposition (S6/S8). Il se stabilise lors de la période d'exposition (S2/S4) et lors de la période de post-exposition (S6/S8).

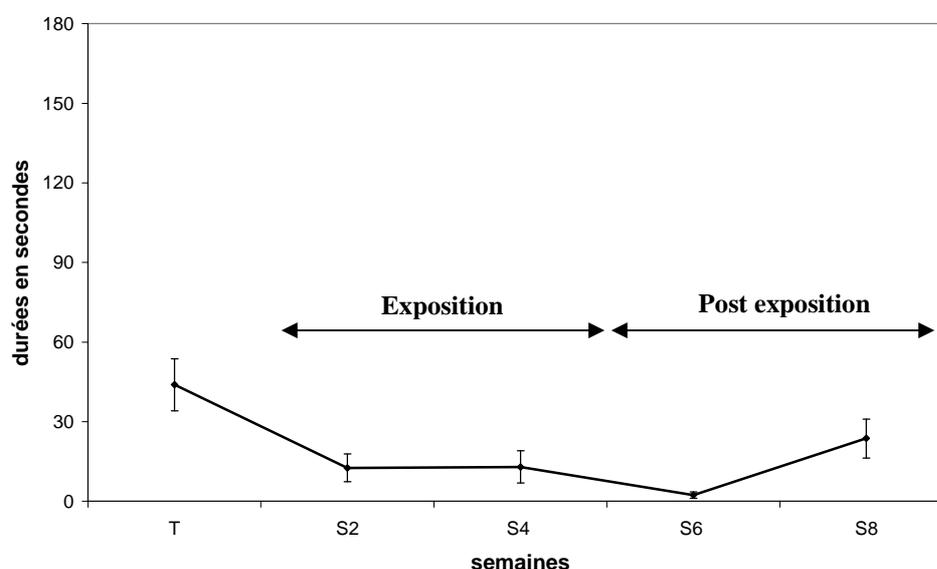
**d/ Résultats des évaluations comportementales avant, pendant et après l'exposition à la pyridine sur une courte durée.**

Avant l'exposition à la pyridine, les tests comportementaux révèlent un caractère neutre (tests contrôles) ou attractif (T) de l'odeur de souris mâle puisqu'elles passent en moyenne 125 secondes dans la zone contenant cette substance. Les résultats des tests comportementaux indiquent que l'exposition à la pyridine entraîne une diminution significative de l'approche des souris pour l'odeur d'urine de souris mâle puisqu'elle se répartissent de façon aléatoire dans la zone contenant l'eau et dans la zone contenant l'urine au cours de l'exposition (S2/S4) et lors de la phase de post exposition (S6/S8), mais ne modifie pas leur comportement vis-à-vis des odeurs de pyridine et de butanol. En effet, le temps passé par les souris dans les zones contenant la pyridine ou la butanol ne varie pas significativement au cours de l'expérimentation.

### 1-3- Exposition au CO<sub>2</sub> (5h)

#### a/ Test d'approche/évitement vis-à-vis du triméthylthiazoline (vs eau)

L'ANOVA concernant le test d'approche/évitement vis-à-vis de l'odeur de triméthylthiazoline montre un effet semaine significatif [F(4,36)=5,826 ; p=0,004] pour l'odeur de triméthylthiazoline (Figure 53). Le temps passé par les souris dans la zone contenant le triméthylthiazoline diminue significativement au cours de l'exposition (S2/S4) et jusqu'en milieu de période de post-exposition (S6). En fin de période de post-exposition (S8), il se rapproche des valeurs mesurées avant l'exposition (T).



**Figure 53:** *haut* : Courbe représentant le temps passé (en secondes) par les souris dans le compartiment contenant le triméthylthiazoline ;  
*gauche* : Tableau indiquant les différences significatives ou non significatives (ns) entre les temps passés dans le compartiment contenant le triméthylthiazoline en fonction des semaines.

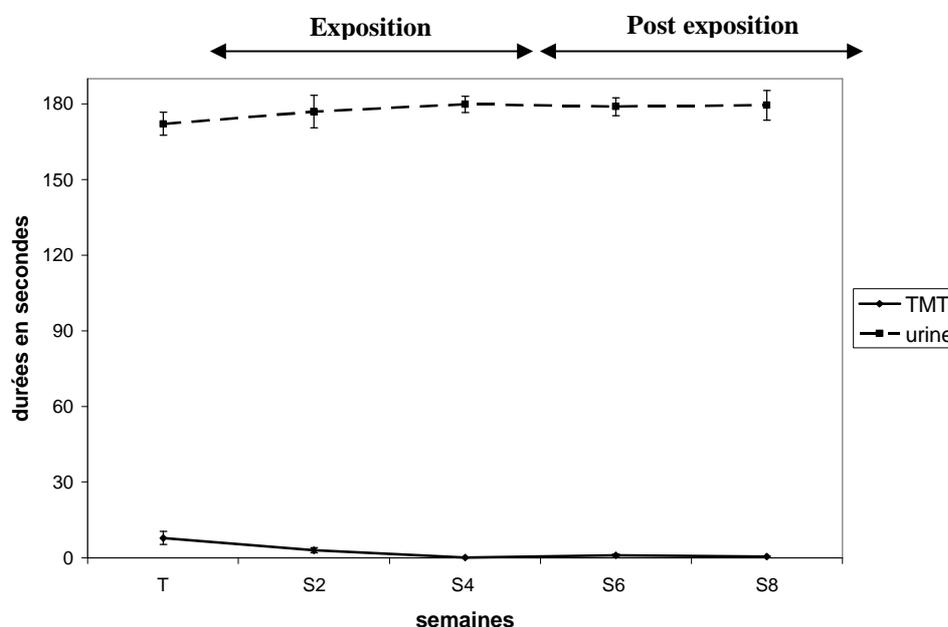
	S2	S4	S6	S8
T	0,0008	0,0013	<0,0001	ns
S2		ns	ns	ns
S4			ns	ns
S6				ns

#### b/ Test d'approche/évitement vis-à-vis de l'urine (vs eau)

L'ANOVA concernant le test d'approche/évitement vis-à-vis de l'odeur d'urine ne montre pas d'effet semaine significatif pour l'odeur d'urine de souris mâle [F(4,36)=7,392 ; p=0,845]. Le temps passé par les souris dans la zone contenant l'urine de souris mâle varie de 90 à 110 secondes au cours de l'expérimentation.

### c/ Test d'approche/évitement: triméthylthiazoline vs urine

L'ANOVA concernant le test d'approche/évitement vis-à-vis de l'odeur de triméthylthiazoline et d'urine montre un effet semaine significatif pour le triméthylthiazoline [F(4,36)=5,114 ; p=0,001] et l'urine de souris mâle [F(4,36)=5,114 ; p=0,001].



TMT	S2	S4	S6	S8
T	0,0135	0,0002	0,0013	0,0008
S2		ns	ns	ns
S4			ns	ns
S6				ns

Urine	S2	S4	S6	S8
T	0,0135	0,0002	0,0013	0,0008
S2		ns	ns	ns
S4			ns	ns
S6				ns

**Figure 55:** *haut* : Courbes représentant le temps passé (en secondes) par les souris dans les compartiments contenant le triméthylthiazoline (TMT) et contenant l'urine de souris mâle ;  
*bas* : Tableaux indiquant les différences significatives ou non significatives (ns) entre les temps passés dans le compartiment contenant le triméthylthiazoline et dans le compartiment contenant l'urine de souris mâle en fonction des semaines.

Le temps passé par les souris au cours de l'exposition (S2/S4) et lors de la période de post-exposition (S6/S8) dans la zone contenant le triméthylthiazoline est significativement supérieur aux valeurs mesurées avant l'exposition (T). Il reste stable au cours de l'expérimentation. Le temps passé par les souris au cours de l'exposition (S2/S4) et lors de la période de post-exposition (S6/S8) dans la zone contenant l'urine de souris mâle est significativement inférieur aux valeurs mesurées avant l'exposition (T). Il reste stable au cours de l'expérimentation.

#### **d/ Résultats des évaluations comportementales avant, pendant et après l'exposition au CO<sub>2</sub> sur une courte durée.**

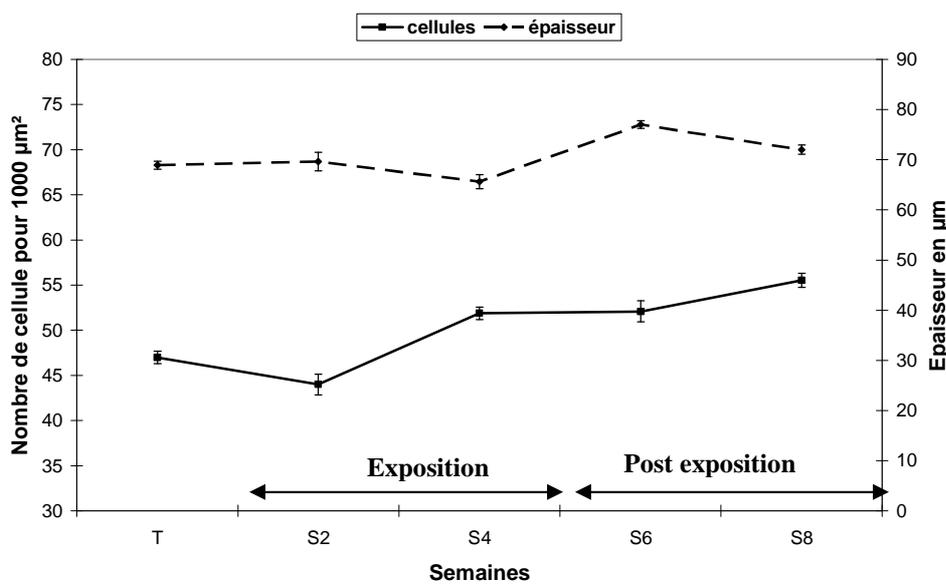
Avant l'exposition au CO<sub>2</sub>, les tests comportementaux révèlent le caractère répulsif du triméthylthiazoline, puisque les souris passent de 10 à 40 secondes (suivant les conditions du tests) dans la zone contenant le triméthylthiazoline. Les résultats des tests comportementaux indiquent que l'exposition au CO<sub>2</sub>(5h) affecte le comportement d'approche/évitement des souris puisqu'une augmentation significative de l'évitement pour les odeur de triméthylthiazoline et des variations du comportement d'approche des souris vis-à-vis de l'odeur d'urine de souris mâle est observée. En effet, le temps passé par les souris dans la zone contenant le triméthylthiazoline diminue significativement du début de l'exposition (S2) et jusqu'au milieu de la période de post exposition (S6). En fin d'expérimentation (S8), il retourne à des valeurs proches de celles mesurées avant l'expérimentation (T). De plus, le comportement des souris vis-à-vis de l'odeur d'urine varie de façon significative au cours de l'expérimentation : le temps passé dans le compartiment contenant l'urine de souris mâle diminue en milieu d'exposition (S2), augmente en fin d'exposition (S4) ainsi qu'en fin d'expérimentation (S8). Le test triméthylthiazoline *versus* urine souligne le caractère fortement répulsif du triméthylthiazoline.

## II- Mesures Histologiques

### 2-1- Exposition à l'acétone

#### a/ Mesures histologiques globales

Les résultats histologiques de l'exposition à l'acétone sont présentés figure 56. (Illustration I A, p99).



Cellules	S2	S4	S6	S8
T	ns	0,0345	0,0436	0,008
S2		0,0079	0,0071	0,0012
S4			ns	ns
S6				ns

**Figure 56:** Courbes indiquant l'évolution de l'épaisseur de l'épithélium olfactif en µm et du nombre de cellules pour une surface de 1000 µm² avant (T), pendant (S2, S4) et après (S6, S8) l'exposition à l'acétone. Le tableau correspond aux résultats *post-hoc* indiquant les différences significatives ou non significatives (ns) pour le nombre de cellules de l'épithélium olfactif en fonction des semaines.

#### Épaisseur de l'épithélium olfactif

L'ANOVA ne montre pas d'effet semaine significatif [F(4,216)=2,795 ; p=0,0854].

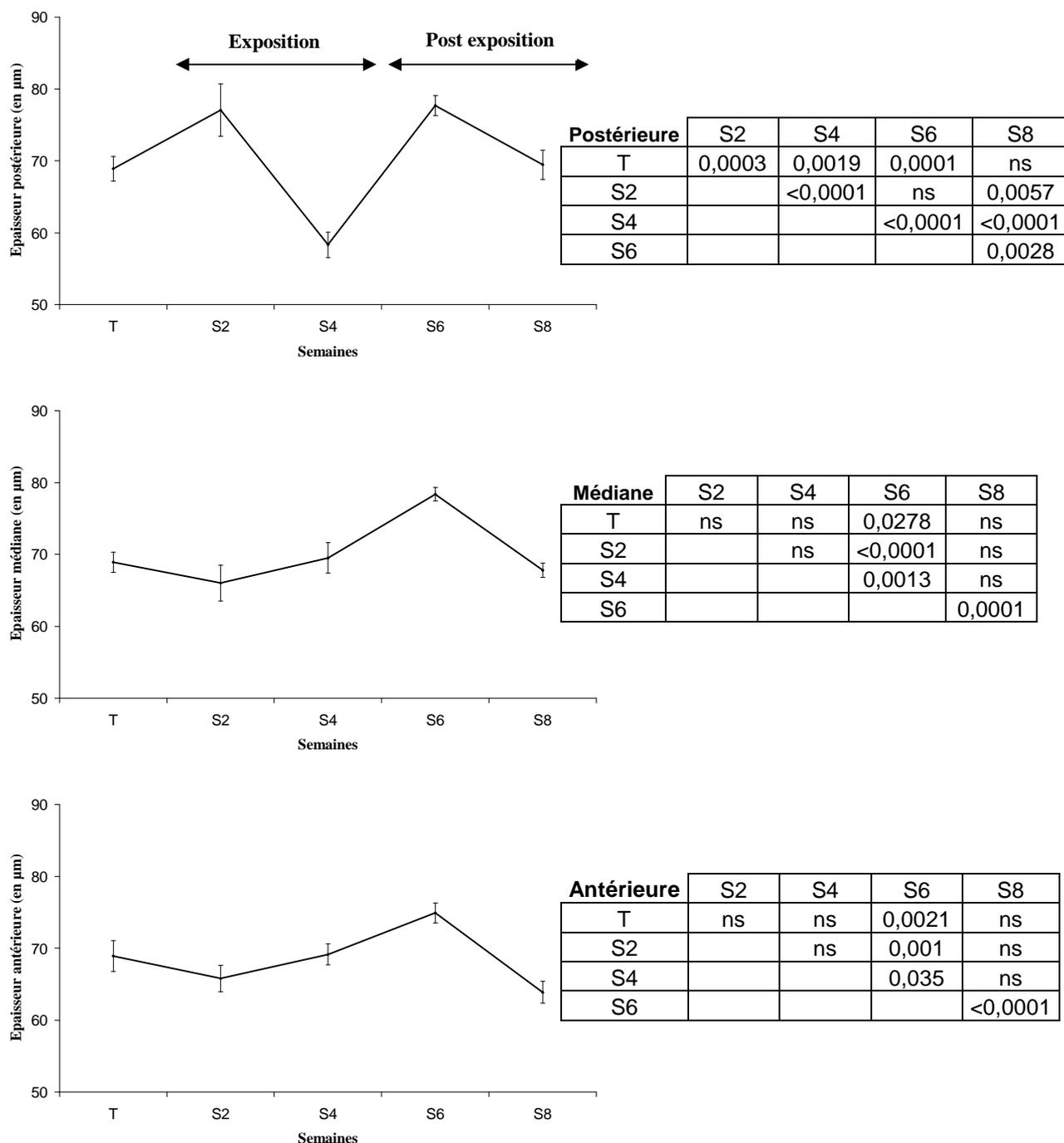
#### Nombre de cellules de l'épithélium olfactif

L'ANOVA montre un effet semaine significatif [F(4,216)=6,657 ; p=0,007]. Une augmentation significative du nombre total de cellules dans l'épithélium olfactif est mesurée à partir de la dernière semaine d'exposition (S4), et reste stable à ce niveau durant la période de post-exposition (S6/S8).

## b/ Mesures histologiques par zones de l'épithélium olfactif

### Épaisseur par zone de l'épithélium olfactif

L'ANOVA montre un effet semaine significatif pour l'épaisseur des zones postérieure  $F(4,72)=12,423$  ;  $p<0,0001$ ], médiane  $F(4,72)=37,15$  ;  $p<0,0001$ ] et antérieure  $F(4,72)=15,283$  ;  $p<0,0001$ ] de l'épithélium olfactif (figure 57).

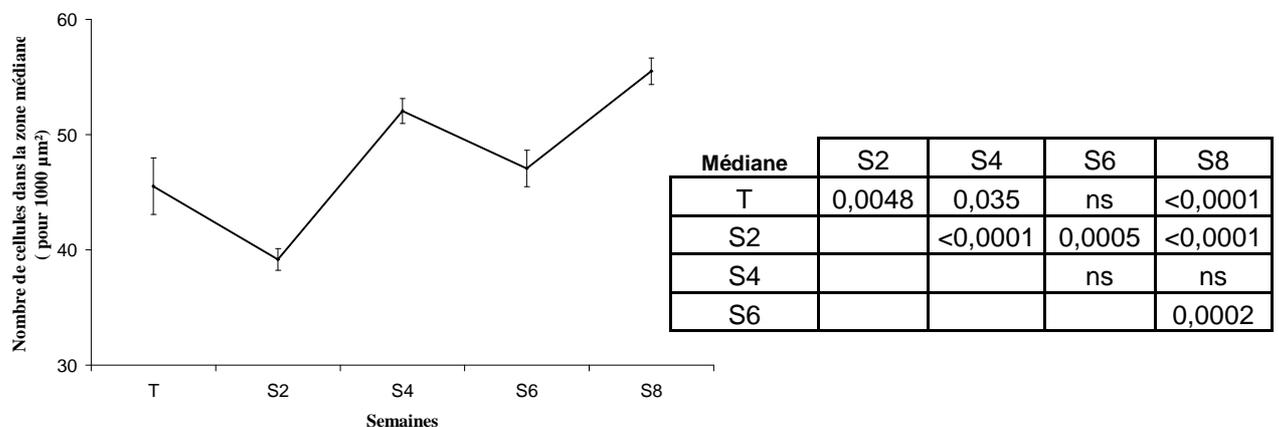
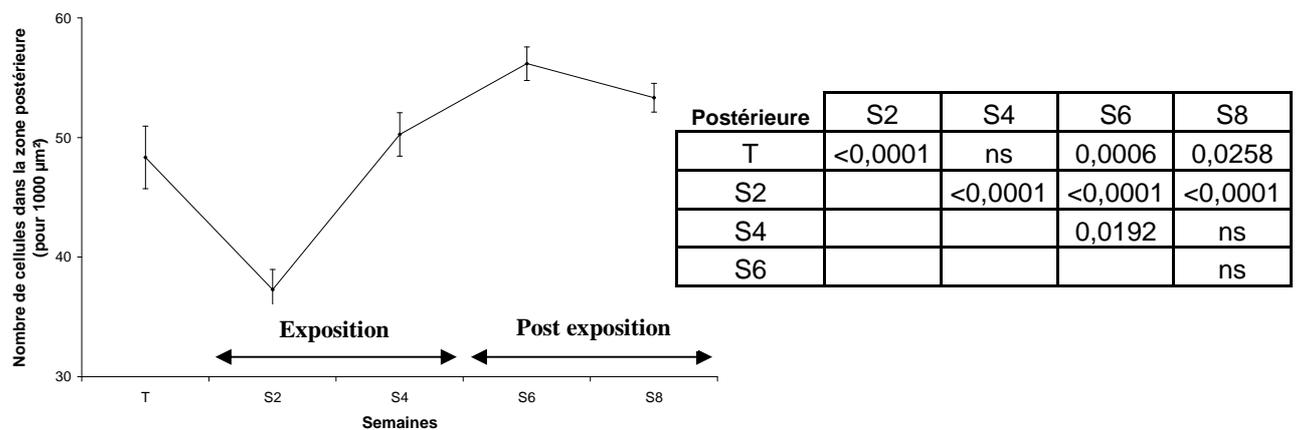


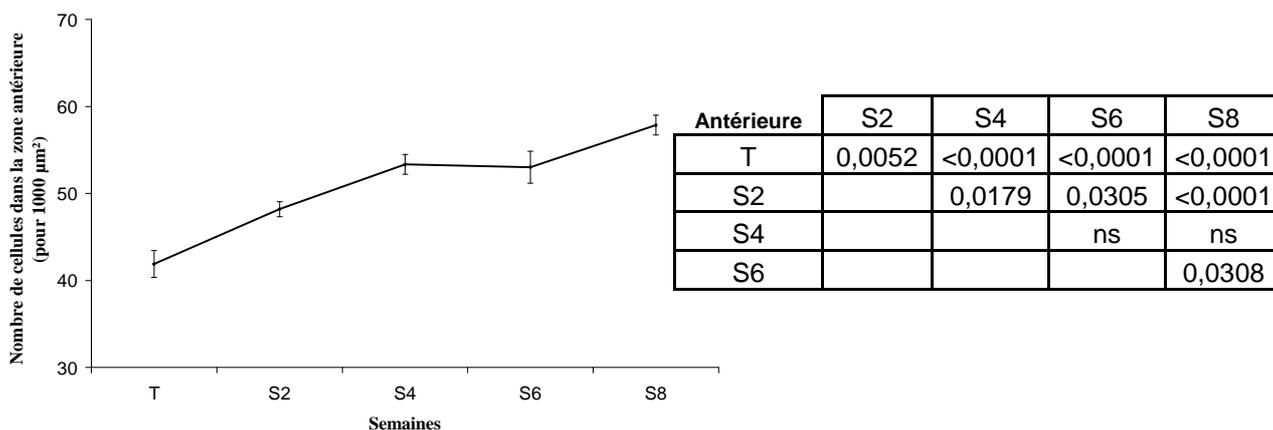
**Figure 57:** Courbes indiquant l'évolution de l'épaisseur de l'épithélium olfactif en µm en fonction des zones l'épithélium olfactif (postérieure, médiane, antérieure) avant (T), pendant (S4 et S6) et après (S6 et S8) l'exposition à l'acétone. Les tableaux situés à droite des courbes correspondent aux résultats *post-hoc* indiquant les différences significatives ou non significatives (ns).

Une évolution similaire de l'épaisseur de l'épithélium olfactif est observée dans les zones médiane et antérieure. En effet, une augmentation significative des épaisseurs est mesurée en milieu de la période de post exposition (S6). En revanche, l'épaisseur postérieure de l'épithélium olfactif présente des résultats différents. Une diminution significative de l'épaisseur dans la zone postérieure de l'épithélium olfactif est mesurée lors de la quatrième d'exposition (S4). Cependant, en fin d'expérimentation (S8), les valeurs des épaisseurs de l'épithélium olfactif pour chaque zone sont comparables aux valeurs mesurées avant l'exposition (T).

### Nombre de cellules par zone de l'épithélium olfactif

L'ANOVA montre un effet semaine significatif pour le nombre de cellules dans les zones postérieure  $F(4,72)=18,115$  ;  $p<0,0001$ ], médiane  $F(4,72)=16,785$  ;  $p<0,0001$ ] et antérieure  $F(4,72)=20,617$  ;  $p<0,0001$ ] de l'épithélium olfactif (figure 58).





**Figure 58:** Courbes indiquant l'évolution du nombre de cellules de l'épithélium olfactif (pour 1000  $\mu\text{m}^2$ ) en fonction des zones de l'épithélium olfactif (postérieure, médiane, antérieure) avant (T), pendant (S2 et S4) et après (S6 et S8) l'exposition à l'acétone. Les tableaux situés à droite des courbes correspondent aux résultats *post hoc* indiquant les différences significatives ou non significatives (ns).

L'évolution du nombre de cellules de l'épithélium olfactif est variable en fonction des zones.

Une diminution significative du nombre de cellule de l'épithélium olfactif est mesurée lors de la deuxième semaine d'exposition (S2) pour les zones postérieure et médiane de l'épithélium olfactif, alors qu'une augmentation significative est mesurée dans la zone antérieure de l'épithélium olfactif, cette augmentation se poursuivant jusqu'en fin de période de post-exposition (S8). Pour les trois zones de l'épithélium olfactif, le nombre de cellules en fin d'expérimentation (S8) est significativement supérieur aux valeurs mesurées avant l'exposition (T).

### **c/ Résultats des évaluations histologiques avant, pendant et après l'exposition à l'acétone sur une courte durée.**

Les résultats indiquent que l'exposition à l'acétone ne modifie pas de façon générale l'épaisseur de l'épithélium olfactif, mais a pour conséquence une augmentation significative du nombre total de cellules dans l'épithélium olfactif à partir de la dernière semaine d'exposition (S4), cette augmentation se maintient durant la période de post-exposition (S6/S8).

En revanche, pour les ceux paramètres histologiques évalués, de nombreuses variations sont mesurées en fonction des zones de l'épithélium olfactif.

Concernant l'épaisseur en fonction des zones de l'épithélium olfactif, on observe une diminution significative de la zone postérieure lors de la quatrième semaine d'exposition

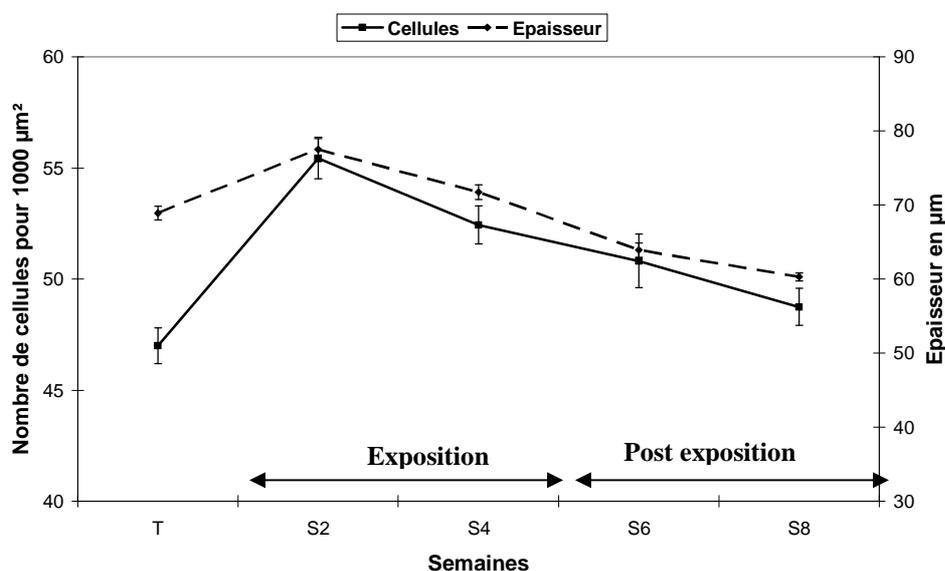
(S4), tandis qu'une augmentation significative au milieu de la période de récupération (S6) est observée pour les zones médiane et antérieure. Cependant, en fin d'expérimentation (S8), les valeurs des épaisseurs de l'épithélium olfactif pour chaque zone sont comparables aux valeurs mesurées avant l'exposition (T).

Concernant le nombre de cellules en fonction des zones de l'épithélium olfactif, une diminution significative lors de la deuxième semaine d'exposition (S2) pour les zones postérieure et médiane de l'épithélium olfactif est observée, alors qu'une augmentation significative est mesurée dans la zone antérieure de l'épithélium olfactif, cette augmentation se poursuivant jusqu'en fin de période de post-exposition (S8). Quelle que soit la zone considérée, le nombre de cellules est supérieur aux valeurs mesurées avant l'exposition (T) à partir de la quatrième semaine d'exposition (S4). Pour les trois zones de l'épithélium olfactif, le nombre de cellules en fin d'expérimentation (S8) est significativement supérieur aux valeurs mesurées avant l'exposition (T).

## 2-2- Exposition à la pyridine

### a/ Mesures histologiques globales

Les résultats histologiques de l'exposition à la pyridine sont présentés figure 59. (Illustration I B, p99).



Cellules	S2	S4	S6	S8
T	<0,0001	<0,0001	0,0002	ns
S2		ns	0,0035	0,0005
S4			ns	ns
S6				ns

Épaisseur	S2	S4	S6	S8
T	<0,0001	ns	0,0017	<0,0001
S2		0,0003	<0,0001	<0,0001
S4			<0,0001	<0,0001
S6				0,0151

**Figure 59:** Courbes indiquant l'évolution de l'épaisseur de l'épithélium olfactif en µm et du nombre de cellules pour une surface de 1000 µm<sup>2</sup> avant (T), pendant (S2, S4) et après (S6, S8) l'exposition à la pyridine. Les tableaux correspondent aux résultats *post-hoc* indiquant les différences significatives ou non significatives (ns) pour l'épaisseur et le nombre de cellules de l'épithélium olfactif en fonction des semaines.

#### Épaisseur de l'épithélium olfactif

L'ANOVA montre un effet semaine significatif [F(4,216)=37,573 ; p<0,0001]. Une augmentation significative de l'épaisseur de l'épithélium olfactif est mesurée en milieu d'exposition (S2), suivie d'un retour à des valeurs comparables à celles mesurées avant l'exposition (T) en fin d'exposition (S4). L'épaisseur de l'épithélium olfactif diminue progressivement au cours de la période de post-exposition (S6/S8).

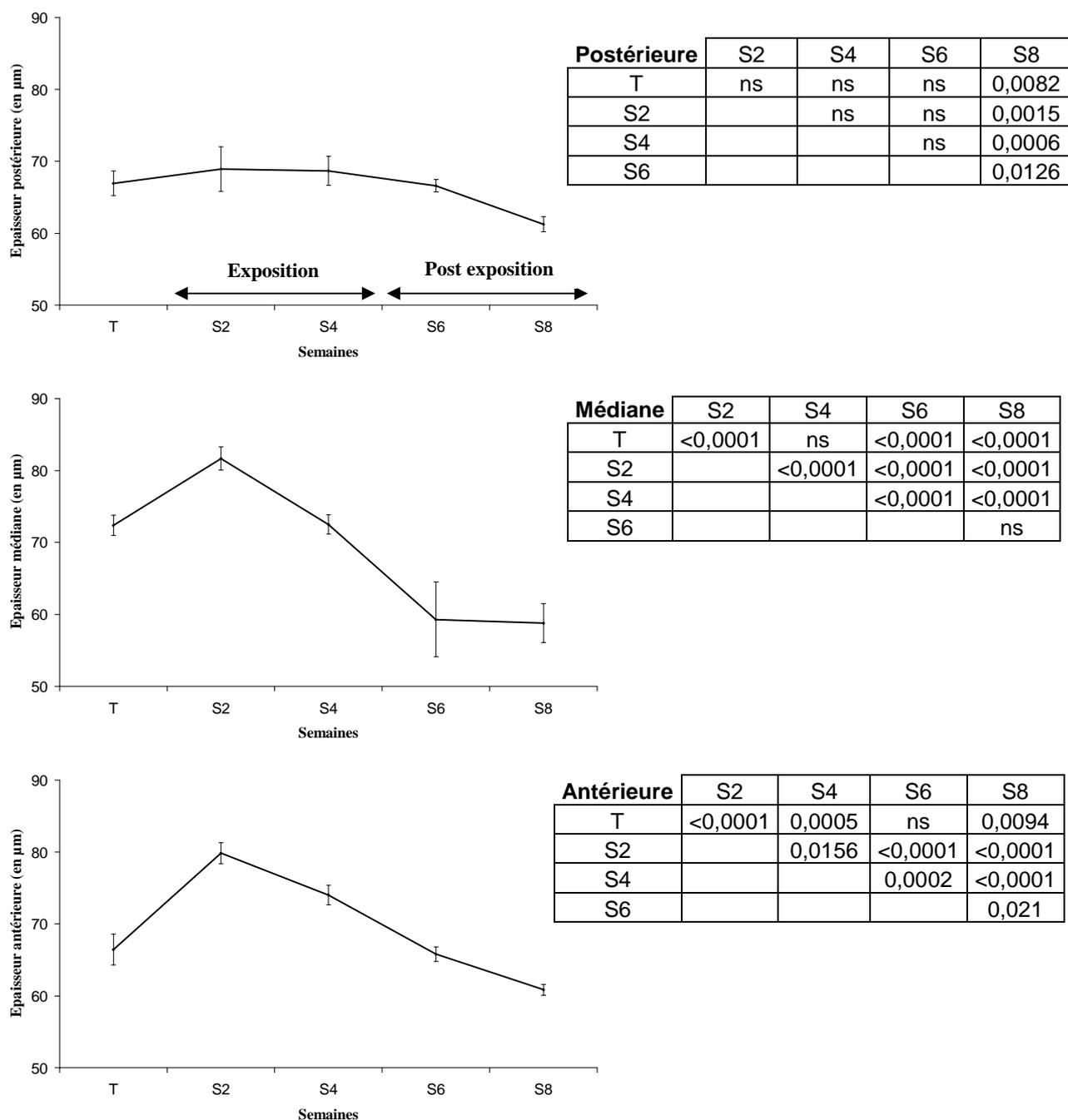
#### Nombre de cellules de l'épithélium olfactif

L'ANOVA montre un effet semaine significatif [F(4,216)=12,063 ; p<0,0001]. Le nombre de cellules de l'épithélium olfactif augmente de façon significative en milieu de période d'exposition (S2), diminue progressivement en fin d'exposition (S4) et jusqu'en milieu de période de post-exposition (S6). En fin de période de post-exposition (S8), il est comparable aux valeurs mesurées avant l'exposition (T).

## b/ Mesures histologiques par zones de l'épithélium olfactif

### Épaisseur par zone de l'épithélium olfactif

L'ANOVA montre un effet semaine significatif pour l'épaisseur des zones postérieure [F(4,72)=3,274 ; p=0,0215], médiane F(4,72)=17,48 ; p<0,0001] et antérieure F(4,72)=13,75 ; p<0,0001] de l'épithélium olfactif (figure 60).

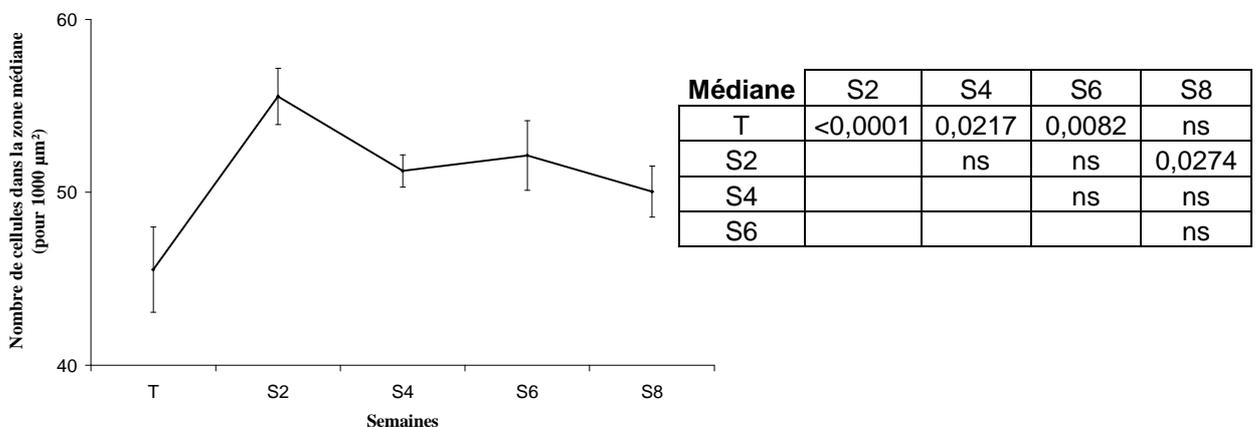
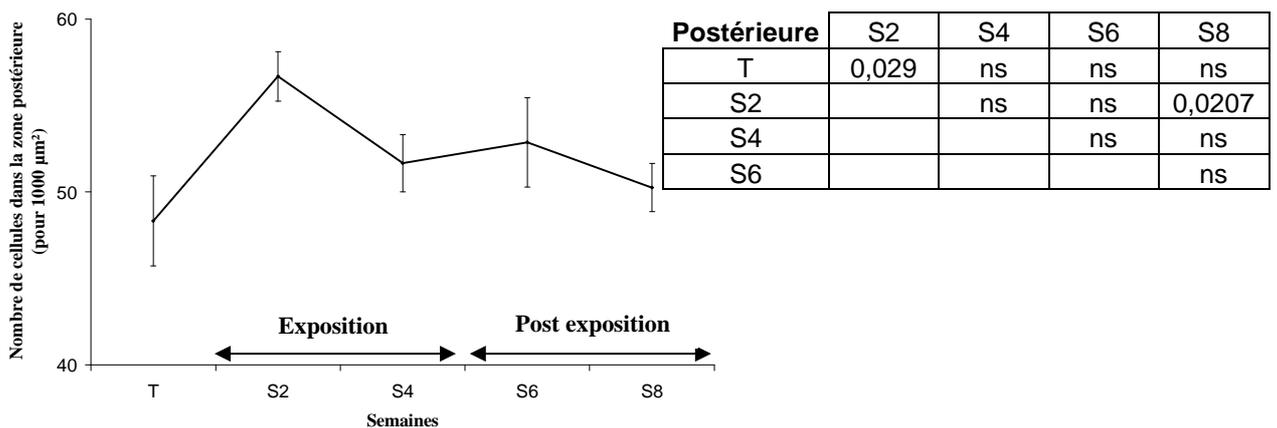


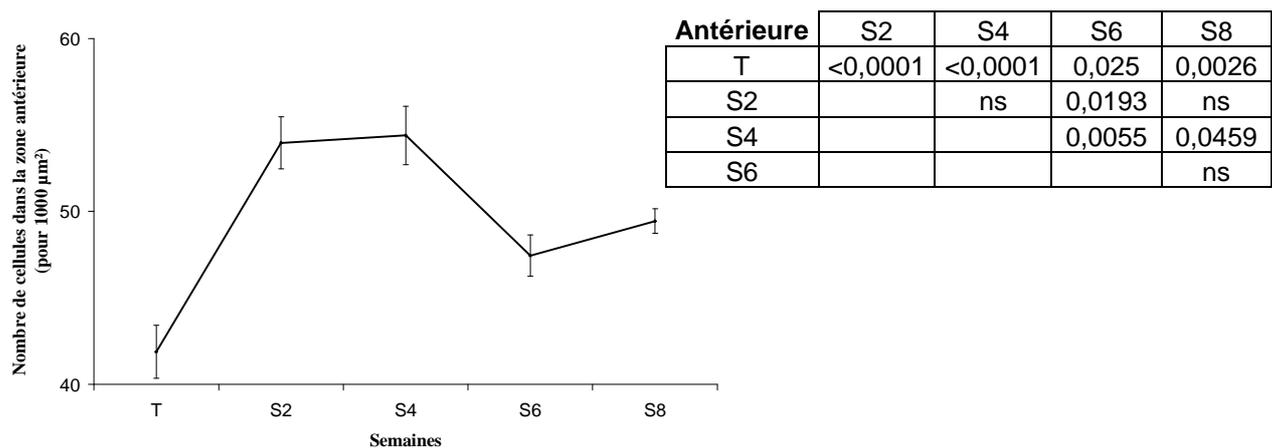
**Figure 60:** Courbes indiquant l'évolution de l'épaisseur en µm en fonction des zones de l'épithélium olfactif (postérieure, médiane, antérieure) avant (T), pendant (S4 et S6) et après (S6 et S8) l'exposition à la pyridine. Les tableaux situés à droite des courbes correspondent aux résultats *post hoc* indiquant les différences significatives ou non significatives (ns).

L'évolution de l'épaisseur de l'épithélium olfactif est comparable dans les zones médiane et antérieure. En effet, une augmentation significative est mesurée lors de la deuxième semaine d'exposition (S2), suivie d'une diminution en fin d'exposition (S6) et lors de la période de post exposition (S6/S8). Pour la zone postérieure, l'épaisseur de l'épithélium olfactif reste constant au cours de l'exposition (S2/S4) et en milieu de période de post exposition (S6) puis diminue de façon significative en fin de période de post-exposition (S8). En fin de période de post-exposition (S8), l'épaisseur de l'épithélium olfactif pour les trois zones est inférieure aux valeurs mesurées avant l'exposition (T).

Nombre de cellules par zone de l'épithélium olfactif

L'ANOVA montre un effet semaine significatif pour le nombre de cellules dans les zones postérieure  $F(4,72)=9,909$  ;  $p=0,042$ ], médiane  $F(4,72)=4,16$  ;  $p=0,0065$ ] et antérieure  $F(4,72)=17,174$  ;  $p<0,0001$ ] de l'épithélium olfactif (figure 61).





**Figure 61:** Courbes indiquant l'évolution du nombre de cellules de l'épithélium olfactif (pour 1000  $\mu\text{m}^2$ ) en fonction des zones de l'épithélium olfactif (postérieure, médiane, antérieure) avant (T), pendant (S2 et S4) et après (S6 et S8) l'exposition à la pyridine. Les tableaux situés à droite des courbes correspondent aux résultats *post hoc* indiquant les différences significatives ou non significatives (ns).

Une augmentation significative du nombre de cellules de l'épithélium olfactif par rapport aux valeurs mesurées avant l'exposition (T) est observée à la deuxième semaine d'exposition (S2) pour les trois zones définies. Ce nombre se stabilise en fin d'exposition (S4) et en milieu de période de post-exposition (S6) pour les zones postérieure et médiane, et diminue en milieu de période de post-exposition (S6) dans la zone antérieure. En fin de période de post-exposition (S8), le nombre total de cellules dans les zones postérieure et médiane est comparable aux valeurs mesurées avant l'exposition (T), tandis que dans la zone antérieure, ce nombre est supérieur aux valeurs mesurées avant l'exposition (T).

**c/ Résultats des évaluations histologiques avant, pendant et après l'exposition à la pyridine sur une courte durée.**

Les résultats montrent que l'exposition à la pyridine a pour conséquence une augmentation significative de l'épaisseur générale et du nombre total de cellules de l'épithélium olfactif en milieu d'exposition (S2), suivie d'une diminution et d'un retour à des valeurs comparables à celles mesurées avant l'exposition (T) en fin de période de post-exposition (S8) pour le nombre total de cellules. En fin de période de post-exposition (S8) l'épaisseur de l'épithélium olfactif est significativement inférieure aux valeurs mesurées avant l'exposition (T).

Concernant l'épaisseur de l'épithélium olfactif par zone, alors qu'elle diminue de façon significative qu'en fin de période de post-exposition (S8) pour la zone postérieure, une

augmentation significative est mesurée lors de la deuxième semaine d'exposition (S2) pour les zones médiane et antérieure. En fin de période de post-exposition (S8), l'épaisseur de l'épithélium olfactif pour les trois zones est inférieure aux valeurs mesurées avant l'exposition (T).

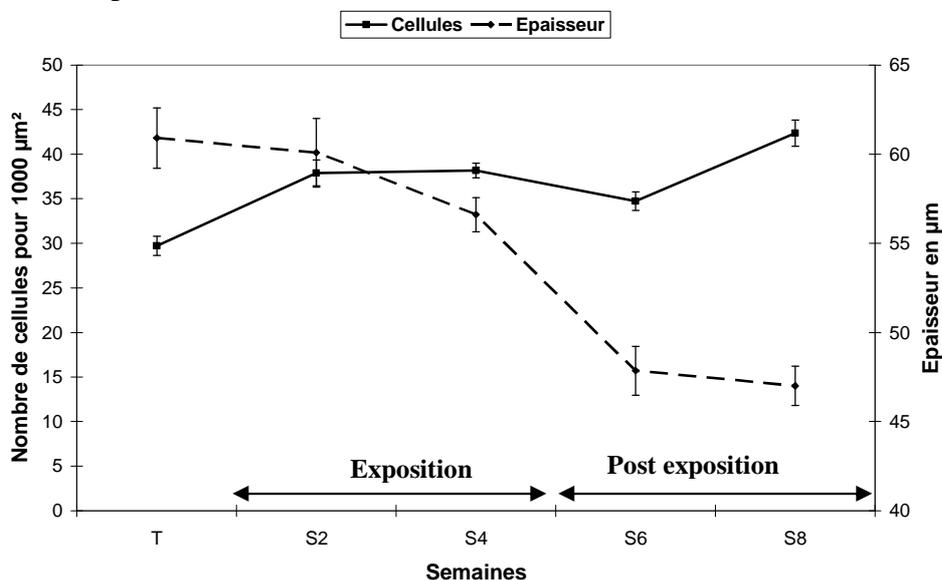
Concernant le nombre total de cellules par zone de l'épithélium olfactif, une augmentation significative par rapport aux valeurs mesurées avant l'exposition (T) est observée à la deuxième semaine d'exposition (S2) pour les trois zones définies. Ce nombre se stabilise en fin d'exposition (S4) et en milieu de période de post-exposition (S6) pour les zones postérieure et médiane, et diminue en milieu de période de post-exposition (S6) dans la zone antérieure. En fin de période de post-exposition (S8), le nombre total de cellules dans les zones postérieure et médiane est comparable aux valeurs mesurées avant l'exposition (T), tandis que dans la zone antérieure, ce nombre est supérieur aux valeurs mesurées avant l'exposition (T).

Pour les deux mesures histologiques – épaisseur et nombre de cellules de l'épithélium olfactif- l'effet principal dans le sens d'une augmentation des mesures est observé de façon précoce lors de la deuxième semaine d'exposition (S2). Cependant, une diminution de ces mesures est ensuite observée en fin d'exposition (S4) et lors de la période de post-exposition (S6/S8).

## 2-3- Exposition au CO<sub>2</sub> (5h)

### a/ Mesures histologiques globales

Les résultats histologiques de l'exposition CO<sub>2</sub> (5h) sont présentés figure 62. (Illustration I C, p99).



Cellules	S2	S4	S6	S8	Epaisseur	S2	S4	S6	S8
T	<0,0001	<0,0001	0,0087	<0,0001	T	ns	0,0403	<0,0001	<0,0001
S2		ns	ns	0,0172	S2		ns	<0,0001	<0,0001
S4			ns	0,0238	S4			0,0015	0,0002
S6				0,0004	S6				ns

**Figure 62:** Courbes indiquant l'évolution de l'épaisseur de l'épithélium olfactif en µm et du nombre de cellules pour une surface de 1000 µm<sup>2</sup> avant (T), pendant (S2, S4) et après (S6, S8) l'exposition au CO<sub>2</sub>. Les tableaux correspondent aux résultats *post hoc* indiquant les différences significatives ou non significatives (ns) pour l'épaisseur et le nombre de cellules de l'épithélium olfactif en fonction des semaines.

#### Epaisseur de l'épithélium olfactif

L'ANOVA montre un effet semaine significatif [F(4,216)=15,27 ; p<0,0001]. Une diminution significative de l'épaisseur de l'épithélium olfactif est mesurée en fin d'exposition (S4), cette diminution se poursuivant au cours de la période de post-exposition (S6). En fin de période de post-exposition (S8), l'épaisseur est significativement inférieure à celle mesurée avant l'exposition (T).

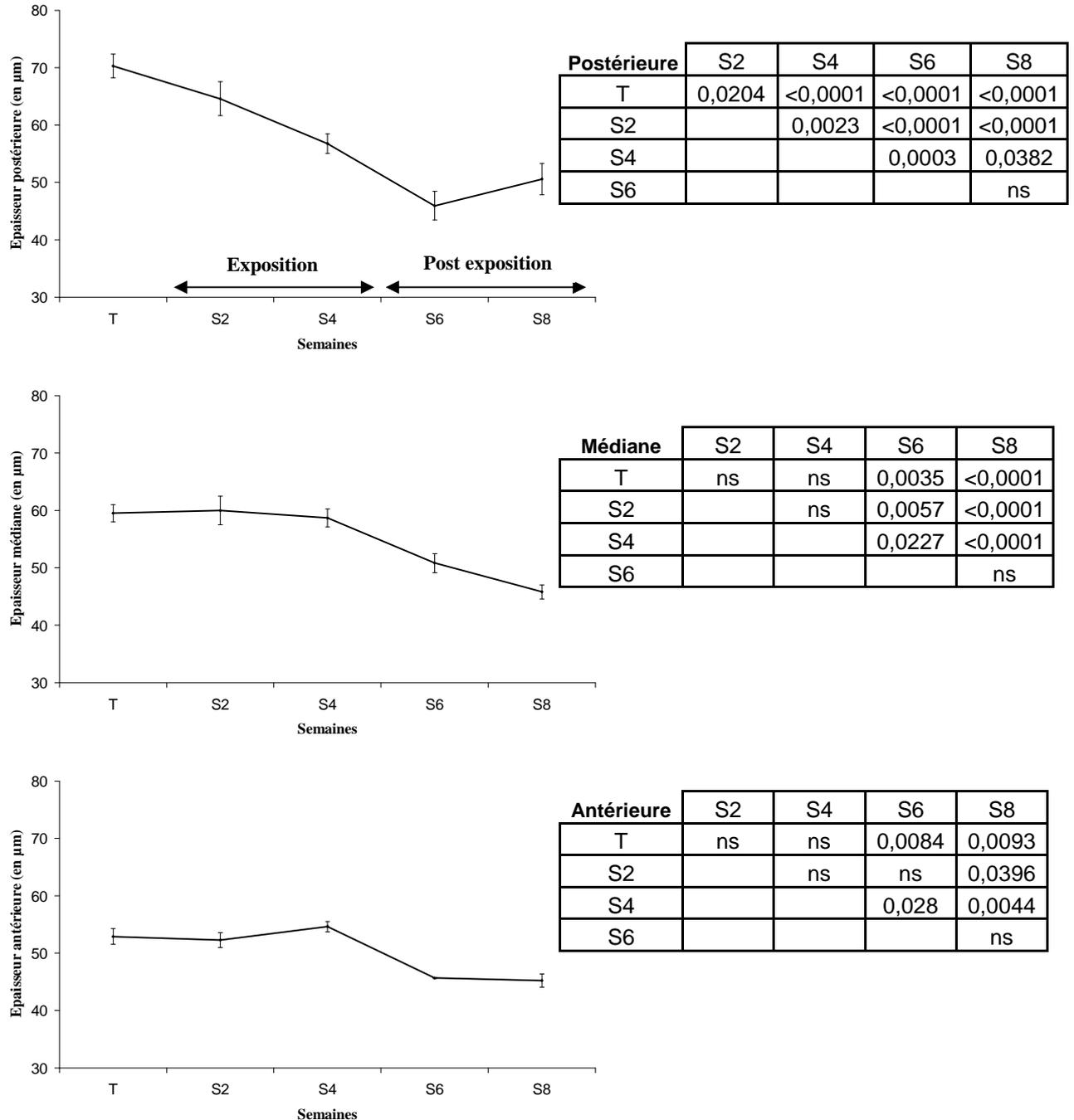
#### Nombre de cellules de l'épithélium olfactif

L'ANOVA montre un effet semaine significatif [F(4,216)=17,624 ; p<0,0001]. Le nombre de cellules augmente significativement en milieu d'exposition (S2), se stabilise en fin d'exposition (S4) et jusqu'en milieu de période de post-exposition (S6). En fin de période de post-exposition (S8), il est significativement supérieur à celui mesuré avant l'exposition (T).

## b/ Mesures histologiques par zones de l'épithélium olfactif

### Épaisseur par zone de l'épithélium olfactif

L'ANOVA montre un effet semaine significatif pour l'épaisseur des zones postérieure  $F(4,72)=15,762$ ;  $p<0,0001$ ], médiane  $F(4,72)=13,846$ ;  $p<0,0001$ ] et antérieure  $F(4,72)=7,558$ ;  $p=0,0008$ ] de l'épithélium olfactif (Figure 63).

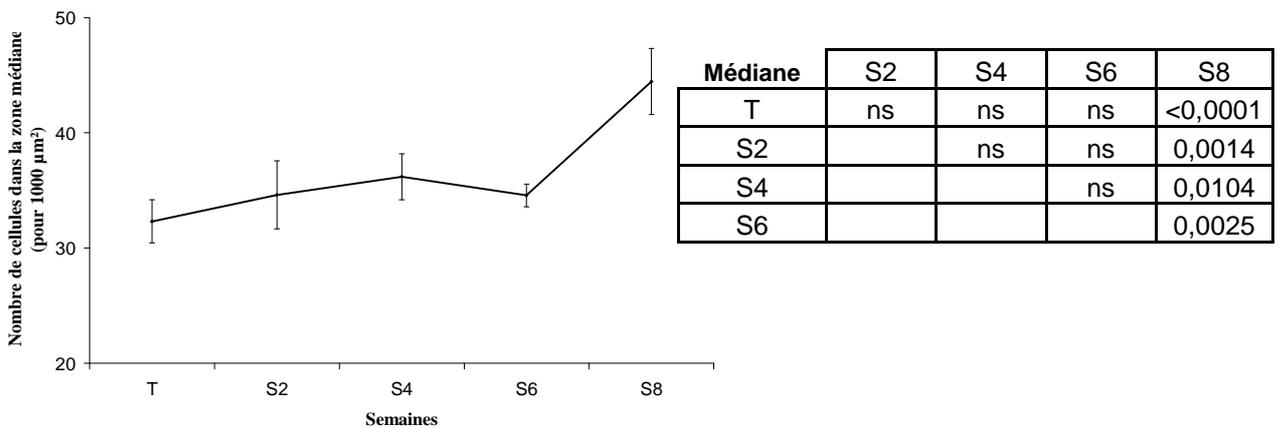
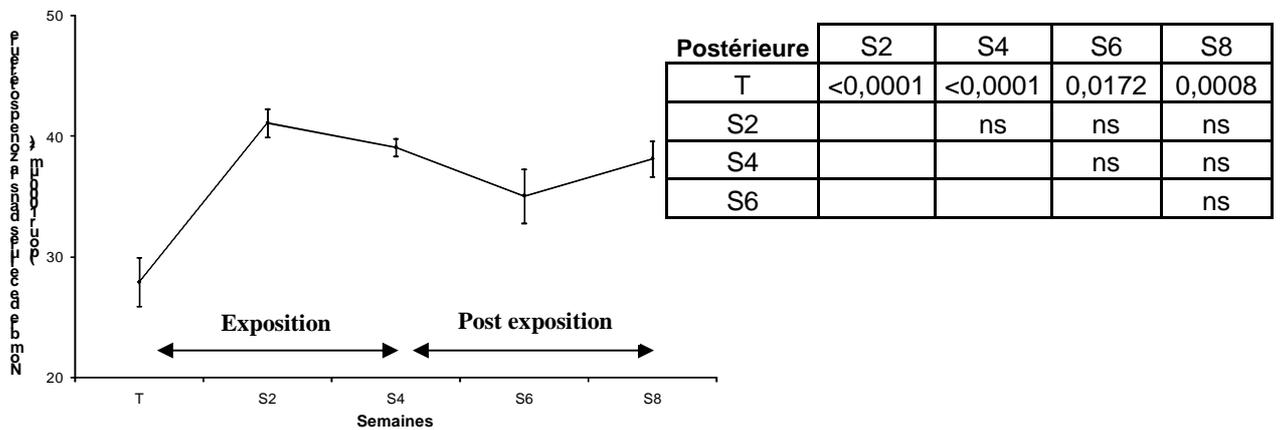


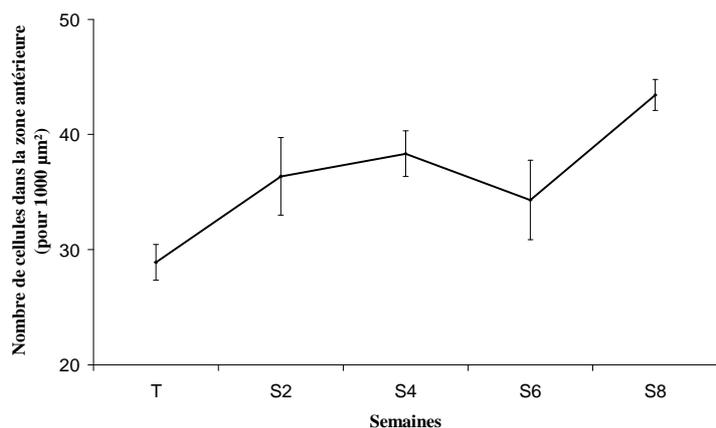
**Figure 63:** Courbes indiquant l'évolution de l'épaisseur en µm en fonction des zones de l'épithélium olfactif (postérieure, médiane, antérieure) avant (T), pendant (S4 et S6) et après (S6 et S8) l'exposition au CO<sub>2</sub>. Les tableaux situés à droite des courbes correspondent aux résultats *post hoc* indiquant les différences significatives ou non significatives (ns).

L'évolution de l'épaisseur de l'épithélium olfactif est semblable dans les zones médiane et antérieure. Elle reste stable lors de l'exposition (S2/S4) puis diminue de façon significative lors de la période de post exposition (S6/S8). En revanche, l'épaisseur postérieure diminue significativement dès la deuxième semaine d'exposition. En fin de période de post-exposition (S8), l'épaisseur de l'épithélium olfactif de chaque zone définie est significativement inférieure aux valeurs mesurées avant l'exposition (T).

Nombre de cellules par zone de l'épithélium olfactif

L'ANOVA montre un effet semaine significatif pour le nombre de cellules dans les zones postérieure  $F(4,72)=12,347$  ;  $p<0,0001$ ], médiane  $F(4,72)=4,462$  ;  $p=0,0082$ ] et antérieure  $F(4,72)=7,519$  ;  $p=0,0008$ ] de l'épithélium olfactif (Figure 64).





Antérieure	S2	S4	S6	S8
T	0,0103	0,0009	ns	<0,0001
S2		ns	ns	0,044
S4			ns	ns
S6				0,0341

**Figure 64:** Courbes indiquant l'évolution du nombre de cellules de l'épithélium olfactif (pour 1000  $\mu\text{m}^2$ ) en fonction des zones de l'épithélium olfactif (postérieure, médiane, antérieure) avant (T), pendant (S2 et S4) et après (S6 et S8) l'exposition au  $\text{CO}_2$ . Les tableaux situés à droite des courbes correspondent aux résultats *post hoc* indiquant les différences significatives ou non significatives (ns).

Une augmentation significative du nombre de cellules est observée dès la deuxième semaine d'exposition (S2) pour les zones postérieure et antérieure. En fin de période de post-exposition (S8), le nombre total de cellules dans les trois zones de l'épithélium olfactif est significativement supérieur aux valeurs mesurées avant l'exposition (T).

### **c/ Résultats des évaluations histologiques avant, pendant et après l'exposition au $\text{CO}_2$ sur une courte durée**

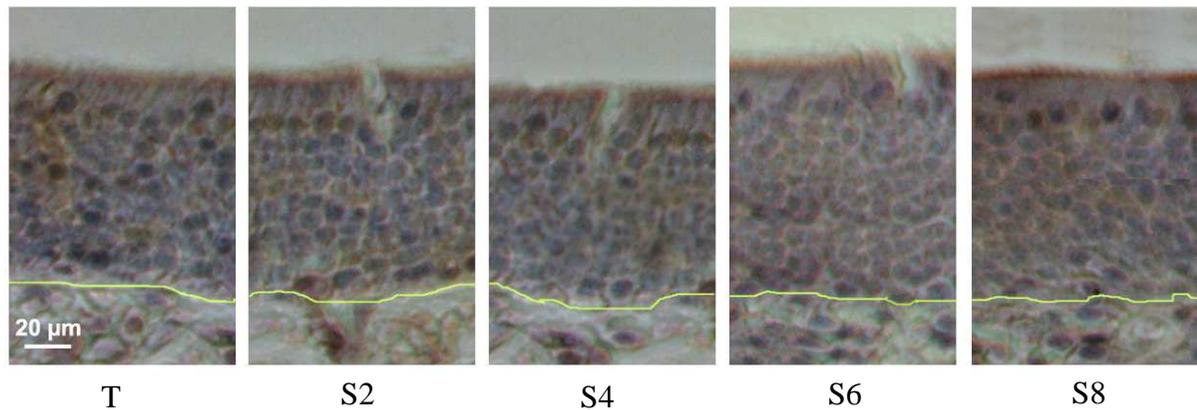
Les résultats indiquent des modifications de l'épaisseur et du nombre de cellules de l'épithélium olfactif suite à l'exposition au  $\text{CO}_2$ (5h), ces modifications étant inverses et décalées dans le temps. En effet, une diminution significative de l'épaisseur générale de l'épithélium olfactif est mesurée en fin d'exposition (S4), et une augmentation significative du nombre total de cellules est observée lors de la deuxième semaine d'exposition (S2). En fin de période de post-exposition (S8), l'épaisseur de l'épithélium olfactif est significativement inférieure aux valeurs mesurées avant l'exposition (T), tandis que le nombre total de cellules est significativement supérieur aux valeurs mesurées avant l'exposition (T).

Concernant l'épaisseur par zones de l'épithélium olfactif, une diminution significative dès la deuxième semaine d'exposition (S2) est mesurée pour l'épaisseur de la zone postérieure

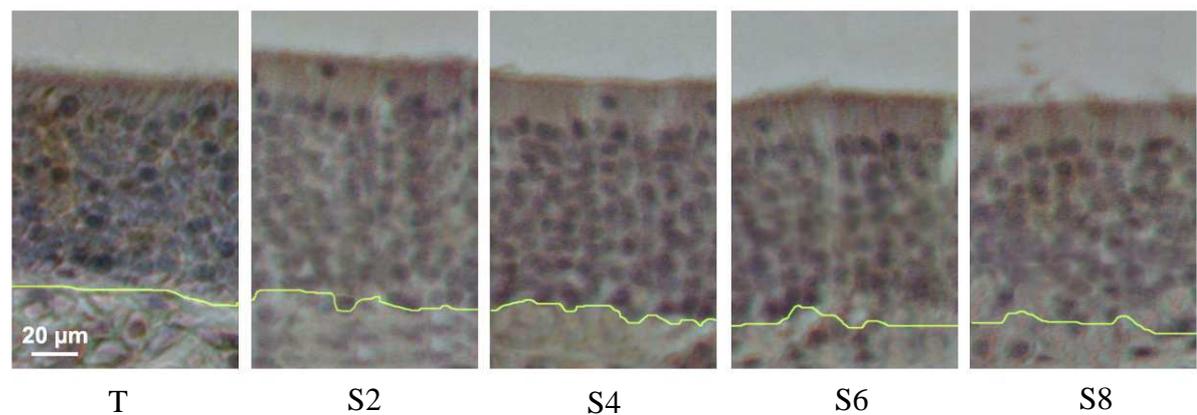
et à partir de la sixième semaine d'exposition (S6) pour les épaisseurs des zones médiane et antérieure. En fin de période de post-exposition (S8), l'épaisseur de l'épithélium olfactif de chaque zone définie est significativement inférieure aux valeurs mesurées avant l'exposition (T).

Concernant le nombre total de cellules par zones de l'épithélium olfactif, une augmentation significative de ce nombre est observée dès la deuxième semaine d'exposition (S2) pour les zones postérieure et antérieure. En fin de période de post-exposition (S8), le nombre total de cellules dans les trois zones de l'épithélium olfactif est significativement supérieur aux valeurs mesurées avant l'exposition (T).

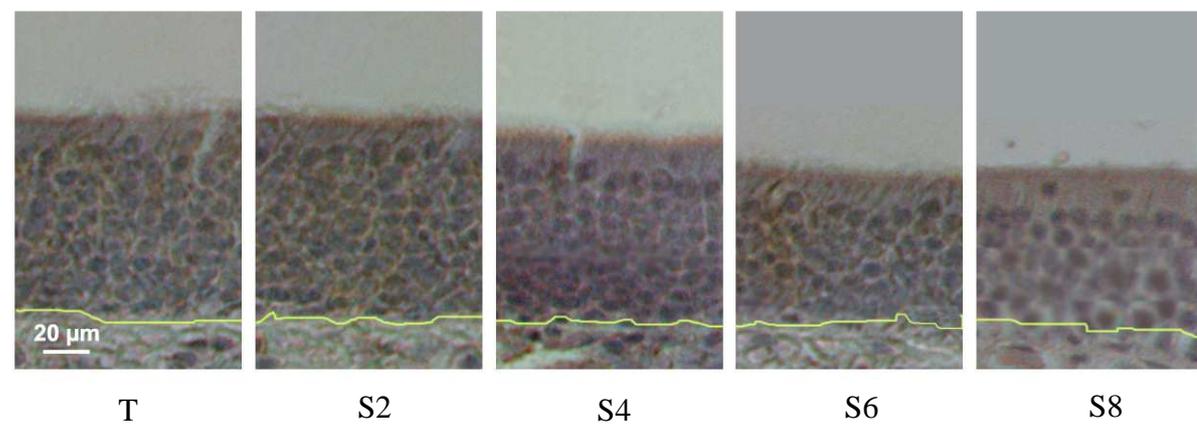
### A. Exposition à l'acétone



### B. Exposition à la pyridine



### C. Exposition au CO<sub>2</sub> (5h)



**Illustration I** : Aspect histologique de l'épithélium olfactif des souris avant (T), pendant (S2/S4) et après (S6/S8) l'exposition à un polluant. Coloration nucléaire à l'hématoxyline de Harris Grossissement x40. La lame basale est indiquée par un trait de couleur jaune.

A : Exposition à l'acétone  
B : Exposition à la pyridine  
C : Exposition au CO<sub>2</sub> (5h)

### III- Récapitulatif des résultats obtenus lors des expositions de courte durée

La figure 65 récapitule les résultats des tests comportementaux mesurés suite aux expositions à l'acétone, à la pyridine et au CO<sub>2</sub>. Les augmentations (↗), ou les absences de modification (∅) du comportement d'approche/évitement des souris par rapport aux valeurs mesurées avant l'exposition (T) pour les substances testées sont indiquées (ne : données non évaluées).

<b>Évitement par rapport à</b>	<b>la substance d'exposition</b>	<b>Butanol</b>	<b>Urine</b>
<b>Acétone (7500 ppm)</b>	↗	∅	∅
<b>Pyridine (3600 ppm)</b>	∅	∅	↘
	<b>TMT</b>	<b>Butanol</b>	<b>Urine</b>
<b>CO<sub>2</sub> (5h) (3%)</b>	↗	ne	variable

**Figure 65:** Récapitulatif des résultats comportementaux obtenus lors des expositions de courte durée.

Les tests comportementaux ont permis de mettre en évidence des modifications du comportement d'approche/évitement des souris pour différentes odeurs en fonction de la molécule d'exposition. Il apparaît que l'exposition à l'acétone et à la pyridine ne modifie pas le comportement d'approche/évitement des souris vis-à-vis de l'odeur de butanol. En revanche, l'exposition à l'acétone a pour conséquence une augmentation de l'évitement des souris pour l'odeur d'acétone, tandis que l'exposition à la pyridine n'entraîne aucune modification du comportement d'approche/évitement des souris par rapport à l'odeur de pyridine. L'exposition à la pyridine a pour conséquence une diminution de l'approche des souris pour l'odeur d'urine de souris mâle, tandis que l'exposition à l'acétone ne modifie pas le comportement d'approche/évitement des souris pour cette odeur. L'exposition au CO<sub>2</sub> montre une modification du comportement d'évitement des souris pour l'odeur de triméthylthiazoline, mais un retour à la normale du comportement des souris vis-à-vis de cette odeur apparaît après l'arrêt de l'exposition.

Ces résultats soulignent des effets variables en fonction de la molécule d'exposition sur le comportement d'évitement des souris pour différents types d'odeurs.

La figure 66 récapitule les résultats des mesures histologiques réalisées en fonction des différents produits d'exposition, et suivant la durée d'exposition. Les augmentations (↗),

les diminutions (↘) ou les stabilisations (≈) de l'épaisseur de l'épithélium olfactif et du nombre total de cellules sont indiquées par rapport aux valeurs obtenues avant l'exposition (T).

Expositions de courte durée	Période d'exposition			
	S2		S4	
	Epaisseur	Nombre de cellules	Epaisseur	Nombre de cellules
Acétone (7500 ppm)	≈	≈	≈	↗
Pyridine (3600 ppm)	↗	↗	≈	↗
CO <sub>2</sub> (5h) (3%)	≈	↗	↘	↗

Expositions de courte durée	Période post exposition			
	S6		S8	
	Epaisseur	Nombre de cellules	Epaisseur	Nombre de cellules
Acétone (7500 ppm)	≈	↗	≈	↗
Pyridine (3600 ppm)	↘	↗	↘	↗
CO <sub>2</sub> (5h) (3%)	↘	↗	↘	↗

**Figure 66:** Récapitulatif des résultats histologiques (épaisseur et nombre total de cellules de l'épithélium olfactif) obtenus lors des expositions de courte durée.

Les résultats des mesures histologiques globales révèlent des variations de l'épaisseur et du nombre total de cellules de l'épithélium olfactif en fonction des substances d'exposition. Les effets sont observés aussi bien au cours de l'exposition qu'après l'arrêt de l'exposition. L'exposition à l'acétone n'entraîne pas de forte modification tissulaire, puisque d'une part l'épaisseur de l'épithélium olfactif ne varie pas au cours de l'expérimentation, et d'autre part une légère augmentation du nombre total de cellules de l'épithélium olfactif est observée au cours de la période de post exposition. En revanche, des effets plus marqués sont mesurés lors des expositions à la pyridine et au CO<sub>2</sub>(5h). Lors de ces expositions, le nombre total de cellules est toujours supérieur aux valeurs mesurées avant l'exposition tout au long de l'expérimentation, alors que l'épaisseur de l'épithélium olfactif diminue, en particulier lors de la période de post exposition.

La figure 67 récapitule les résultats des mesures histologiques réalisées sur les trois zones (postérieure, médiane, antérieure) de l'épithélium olfactif en fonction des substances d'exposition, et suivant la durée d'exposition. Les augmentations (↗), les diminutions (↘) ou les stabilisations (≈) de l'épaisseur de l'épithélium olfactif et du nombre total de cellules sont indiquées par rapport aux valeurs obtenues avant l'exposition (T).

<b>A : Epaisseur</b>	<b>Période d'exposition</b>					
	<b>S2</b>			<b>S4</b>		
	zone postérieure	zone médiane	zone antérieure	zone postérieure	zone médiane	zone antérieure
<i>Expositions de courte durée</i>						
<b>Acétone</b> (9800 ppm)	↗	≈	≈	↘	≈	≈
<b>Pyridine</b> (6000 ppm)	≈	↗	↗	≈	≈	↗
<b>CO<sub>2</sub> (5h)</b> (3%)	↘	≈	≈	↘	≈	≈

	<b>Période post exposition</b>					
	<b>S6</b>			<b>S8</b>		
	zone postérieure	zone médiane	zone antérieure	zone postérieure	zone médiane	zone antérieure
<i>Expositions de courte durée</i>						
<b>Acétone</b> (9800 ppm)	↗	↗	↗	≈	≈	≈
<b>Pyridine</b> (6000 ppm)	≈	↘	≈	↘	↘	↘
<b>CO<sub>2</sub> (5h)</b> (3%)	↘	↘	↘	↘	↘	↘

<b>B : Nombre de cellules</b>	<b>Période d'exposition</b>					
	<b>S2</b>			<b>S4</b>		
	zone postérieure	zone médiane	zone antérieure	zone postérieure	zone médiane	zone antérieure
<i>Expositions de courte durée</i>						
<b>Acétone</b> (9800 ppm)	↘	↘	↗	≈	↗	↗
<b>Pyridine</b> (6000 ppm)	↗	↗	↗	≈	↗	↗
<b>CO<sub>2</sub> (5h)</b> (3%)	↗	≈	↗	↗	≈	↗

	<b>Période post exposition</b>					
	<b>S6</b>			<b>S8</b>		
	zone postérieure	zone médiane	zone antérieure	zone postérieure	zone médiane	zone antérieure
<i>Expositions de courte durée</i>						
<b>Acétone</b> (9800 ppm)	↗	≈	↗	↗	↗	↗
<b>Pyridine</b> (6000 ppm)	≈	↗	↗	≈	≈	↗
<b>CO<sub>2</sub> (5h)</b> (3%)	↗	≈	≈	↗	↗	↗

**Figure 67:** Récapitulatif des résultats histologiques obtenus lors des expositions de courte durée en fonction des zones de l'épithélium olfactif (postérieure, médiane, antérieure).

**A** : épaisseur/ **B** : nombre total de cellules de l'épithélium olfactif

Les résultats des mesures histologiques révèlent que des différences apparaissent d'une part en fonction de la zone considérée, et d'autre part en fonction de la substance d'exposition. Les résultats ne montrent pas la même évolution lors de l'exposition au CO<sub>2</sub> en comparaison avec l'acétone et la pyridine. Pour les trois substances d'exposition, les évolutions du nombre de cellules dans les trois zones de l'épithélium olfactif diffèrent. Concernant l'acétone, en cours d'exposition (S2), une diminution du nombre total de

cellules apparaît, alors qu'une augmentation est mesurée dans la zone antérieure. En revanche, en fin d'exposition (S4), le nombre total de cellules est supérieur aux valeurs mesurées avant l'exposition (T) pour les trois zones (postérieure, médiane et antérieure). Lors de l'exposition à la pyridine, le nombre de cellules suit de façon générale la même dynamique d'évolution dans les trois zones (postérieure, médiane et antérieure) ; en effet, il augmente dès le milieu de l'exposition (S2), diminue en fin d'exposition (S4) ou au milieu de la période post exposition (S6), et finalement reste plus élevée que les valeurs obtenues avant l'expérimentation (T) en post exposition (S8). Concernant l'exposition au CO<sub>2</sub>, les zones postérieures et antérieures suivent la même évolution : une augmentation du nombre de cellules dès le milieu d'exposition (S2) est suivi d'une stabilisation durant le reste de l'expérimentation.

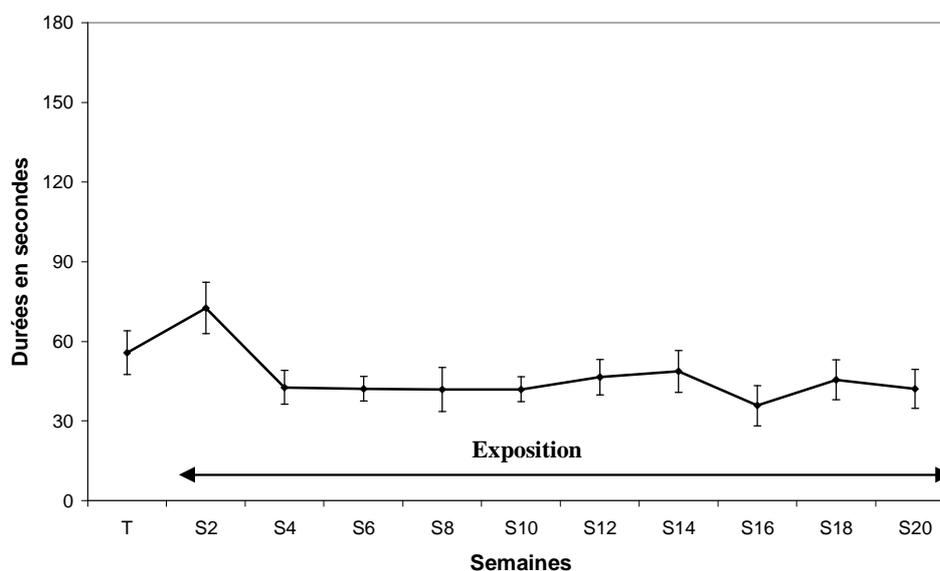
**Partie 3 :**  
**Influence de la durée et de la concentration d'exposition sur**  
**l'épithélium olfactif principal des souris.**

## I- Evaluations comportementales

### 1-1- Exposition à la pyridine

#### a/ Test d'approche/évitement vis-à-vis de la pyridine (vs eau)

L'ANOVA concernant le test d'approche/évitement vis-à-vis de l'odeur de pyridine montre un effet semaine significatif [ $F(10,90)=1,874$  ;  $p=0,0416$ ].



	S2	S4	S6	S8	S10	S12	S14	S16	S18	S20
T	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
S2		0,0041	0,0041	0,0037	0,0033	0,0121	0,0212	0,0004	0,0093	0,0034
S4			ns							
S6				ns						
S8					ns	ns	ns	ns	ns	ns
S10						ns	ns	ns	ns	ns
S12							ns	ns	ns	ns
S14								ns	ns	ns
S16									ns	ns
S18										ns

**Figure 68 :** *haut* : Courbe représentant le temps passé (en secondes) par les souris dans le compartiment contenant la pyridine;

*bas* : Tableau indiquant les différences significatives ou non significatives (ns) entre les temps passés dans le compartiment contenant la pyridine en fonction des semaines.

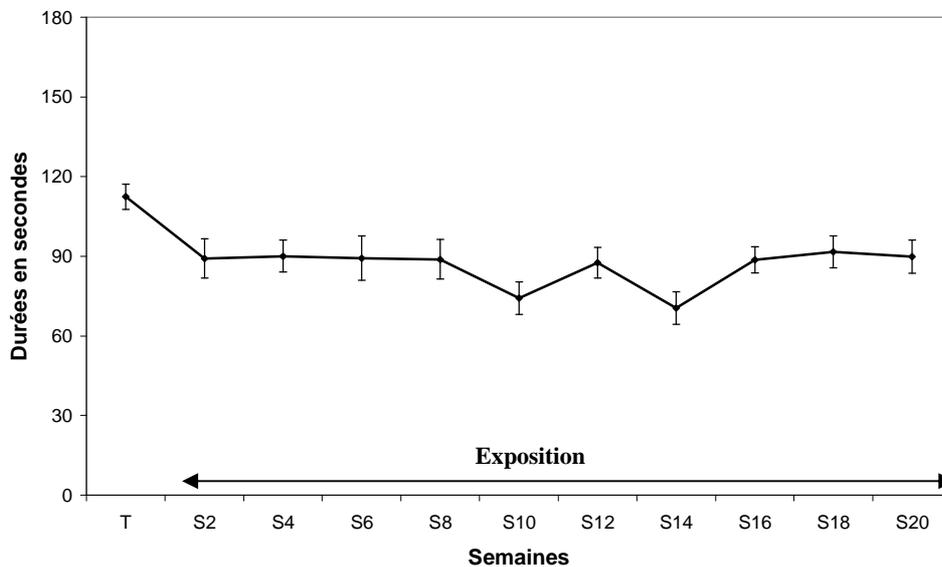
Le comportement d'évitement des souris vis-à-vis de l'odeur de pyridine ne varie pas au cours de l'exposition (de S2 à S20) par rapport aux valeurs mesurées avant l'exposition (T) (Figure 68). Une légère diminution de l'évitement des souris pour l'odeur de pyridine est observée lors de la deuxième semaine d'exposition (S2) en comparaison avec les autres semaines d'exposition (de S4 à S20).

### b/ Test d'approche/évitement vis-à-vis du butanol (vs eau)

L'ANOVA concernant le test d'approche/évitement vis-à-vis de l'odeur de butanol ne montre pas d'effet semaine significatif [ $F(10,90)=1,072$  ;  $p=0,3868$ ]. Le temps passé par les souris dans la zone contenant le butanol varie de 38,6 à 49,8 secondes au cours de l'expérimentation.

### c/ Test d'approche/évitement vis-à-vis de l'urine (vs eau)

L'ANOVA concernant le test d'approche/évitement vis-à-vis de l'odeur d'urine de souris mâle montre un effet semaine significatif [ $F(10,90)=2,458$  ;  $p=0,0028$ ].



	S2	S4	S6	S8	S10	S12	S14	S16	S18	S20
T	0,086	0,0128	0,01	0,0099	<0,0001	0,0058	<0,0001	0,0084	0,0207	0,0119
S2		ns	ns	ns	ns	ns	0,0379	ns	ns	ns
S4			ns	ns	ns	ns	0,0318	ns	ns	ns
S6				ns	ns	ns	0,0392	ns	ns	ns
S8					ns	ns	0,0471	ns	ns	ns
S10						ns	ns	ns	ns	ns
S12							ns	ns	ns	ns
S14								0,0455	0,0203	0,0338
S16									ns	ns
S18										ns

**Figure 69:** *haut* : Courbe représentant le temps passé (en secondes) par les souris dans le compartiment contenant l'urine de souris mâle ;  
*bas* : Tableau indiquant les différences significatives ou non significatives (ns) entre les temps passés dans le compartiment contenant l'urine de souris mâle en fonction des semaines.

Une diminution de l'approche pour l'urine de souris mâle est mesurée dès la deuxième semaine d'exposition (S2) jusqu'en fin d'exposition (S20) (Figure 69). Les souris passent alors en moyenne le même temps dans la zone contenant l'urine de souris mâle que dans la zone contenant l'eau.

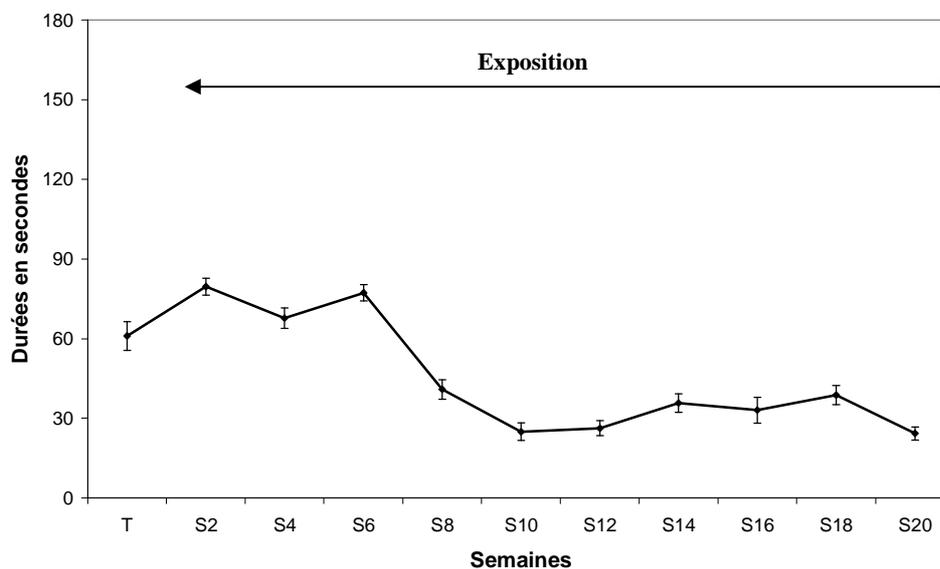
**d/ Résultats des évaluations comportementales avant, pendant et après l'exposition à la pyridine sur une longue durée.**

Les résultats des tests comportementaux révèlent que l'exposition à la pyridine n'affecte pas le comportement des souris vis-à-vis de l'odeur de pyridine, diminue le comportement d'approche des souris vis-à-vis de l'odeur d'urine de souris mâle, et ne modifie pas le comportement des souris vis-à-vis de l'odeur de butanol. Dans les deux cas, la modification observée est durable et stable tout au long des 20 semaines d'exposition.

## 1-2- Exposition au toluène

### a/ Test d'approche/évitement vis-à-vis du toluène (vs eau)

L'ANOVA concernant le test d'approche/évitement vis-à-vis de l'odeur de toluène montre un effet semaine significatif [ $F(10,90)=8,08$  ;  $p<0,0001$ ].



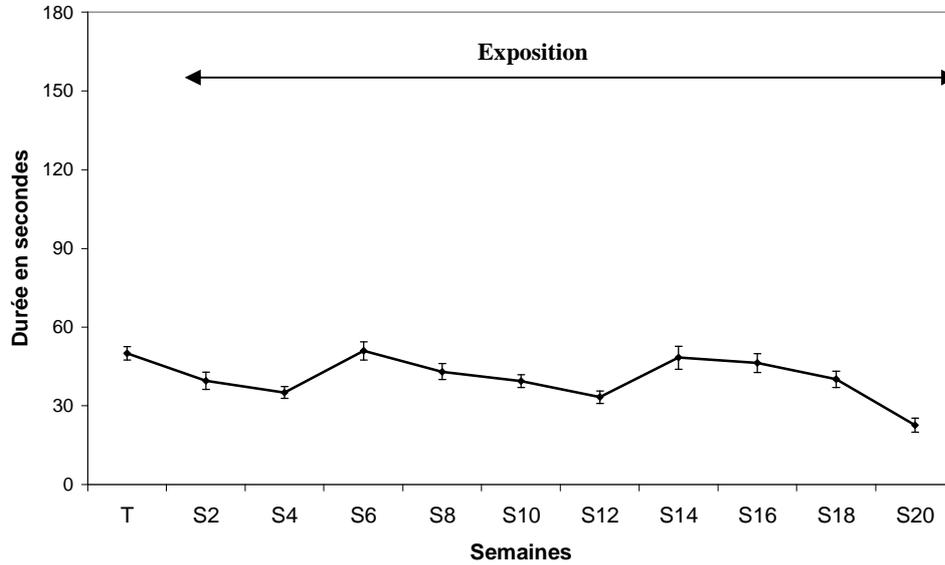
	S2	S4	S6	S8	S10	S12	S14	S16	S18	S20
T	ns	ns	ns	ns	0,0007	0,001	0,0167	0,0084	0,0499	0,0009
S2		ns	ns	0,0002	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,0004	<0,0001
S4			ns	0,0101	<0,0001	<0,0001	0,0026	0,0011	0,11	<0,0001
S6				0,0005	<0,0001	<0,0001	0,0001	<0,0001	0,0008	<0,0001
S8				ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
S10					ns	ns	ns	ns	ns	ns
S12						ns	ns	ns	ns	ns
S14							ns	ns	ns	ns
S16								ns	ns	ns
S18									ns	ns

**Figure 70:** *haut* : Courbe représentant le temps passé (en secondes) par les souris dans le compartiment contenant le toluène ;  
*bas* : Tableau indiquant les différences significatives ou non significatives (ns) entre les temps passés dans le compartiment contenant le toluène en fonction des semaines.

Le temps passé par les souris dans la zone contenant le toluène ne varie pas significativement au cours des huit premières semaines d'exposition (de S2 à S8), puis diminue de façon significative de la dixième (S10) à la vingtième semaine d'exposition (S20). Il reste ensuite stable jusqu'en fin d'exposition (S20) (Figure 70).

**b/ Test d'approche/évitement vis-à-vis du butanol (vs eau)**

L'ANOVA concernant le test d'approche/évitement vis-à-vis de l'odeur de butanol montre un effet semaine significatif [F(10,90)=1,905 ; p=0,0473].



	S2	S4	S6	S8	S10	S12	S14	S16	S18	S20
T	ns	0,0465	ns	ns	ns	0,0399	ns	ns	ns	0,0033
S2		ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
S4			0,0259	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
S6				ns	ns	0,0146	ns	ns	ns	0,01
S8					ns	ns	ns	ns	ns	0,0312
S10						ns	ns	ns	ns	0,049
S12							0,044	ns	ns	ns
S14								ns	ns	0,0059
S16									ns	ns
S18										ns

**Figure 71 :** *haut* : Courbe représentant le temps passé (en secondes) par les souris dans le compartiment contenant le butanol;

*bas* : Tableau indiquant les différences significatives ou non significatives (ns) entre les temps passés dans le compartiment contenant le butanol en fonction des semaines.

Le temps passé par les souris dans la zone contenant le butanol diminue de façon significative à la quatrième (S4), la douzième (S12), et la vingtième (S20) semaine d'exposition. Entre ces mesures, les valeurs sont comparables à celles mesurées avant l'exposition (T).

**c/ Test d'approche/évitement vis-à-vis de l'urine (vs eau)**

L'ANOVA concernant le test d'approche/évitement vis-à-vis de l'odeur d'urine de souris mâle ne montre pas d'effet semaine significatif [F(10,90)=1,811 ; p=0,0613]. Le temps

passé par les souris dans la zone contenant l'urine de souris mâle varie de 71,5 à 108,8 secondes au cours de l'expérimentation.

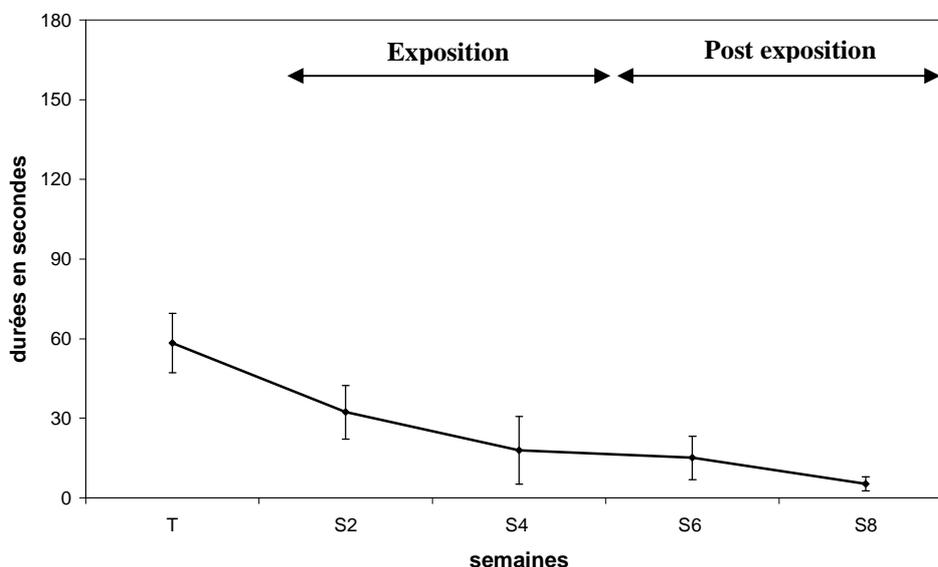
**d/ Résultats des évaluations comportementales avant, pendant et après l'exposition au toluène sur une longue durée.**

Les résultats des tests comportementaux indiquent que l'exposition au toluène modifie le comportement des souris en augmentant l'évitement pour les odeurs de toluène et de butanol, mais ne change pas le comportement des souris vis-à-vis de l'odeur de souris mâle. En effet, les souris passent significativement moins de temps dans la zone contenant le toluène à partir de la dixième semaine d'exposition (S10). De plus, le temps passé par les souris dans la zone contenant le butanol diminue significativement de façon périodique à S4, S12 et S20. Toutefois, la cinétique d'évolution est différente ; l'effet est plus marqué pour le toluène que pour le butanol. Les modifications comportementales sont observées relativement tardivement pour le toluène (à S8) et elles restent stables, tandis qu'elles sont précoces (S4) et irrégulières lors du test mené avec le toluène.

### 1-3- Exposition au CO<sub>2</sub> (12h)

#### a/ Test d'approche/évitement vis-à-vis du triméthylthiazoline (vs eau)

L'ANOVA concernant le test d'approche/évitement vis-à-vis de l'odeur de triméthylthiazoline montre un effet semaine significatif [F(4,36)=4,722; p=0,002].



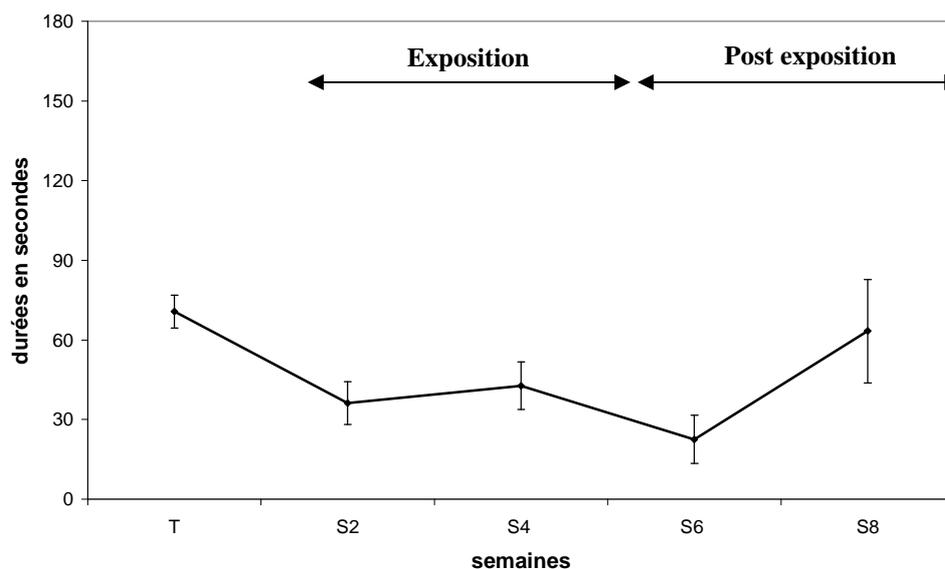
	S2	S4	S6	S8
T	0,0461	0,0042	0,0023	0,0002
S2		ns	ns	ns
S4			ns	ns
S6				ns

**Figure 72:** *haut* : Courbe représentant le temps passé (en secondes) par les souris dans le compartiment contenant le triméthylthiazoline ;  
*gauche* : Tableau indiquant les différences significatives ou non significatives (ns) entre les temps passés dans le compartiment contenant le triméthylthiazoline en fonction des semaines.

Le temps passé par les souris dans la zone contenant le triméthylthiazoline diminue progressivement au cours de l'exposition (S2/S4) et de la période de post-exposition (S6/S8). En fin de période de post-exposition (S8), il est significativement inférieur aux valeurs mesurées avant l'exposition (T) (Figure 72).

#### b/ Test d'approche/évitement vis-à-vis du butanol (vs eau)

L'ANOVA concernant le test d'approche/évitement vis-à-vis de l'odeur de butanol A montre un effet significatif [F(4,36)=3,525; p=0,0125]. Le temps passé par les souris dans la zone contenant le butanol diminue de façon significative au cours de l'exposition (S2/S4) et jusqu'en milieu de période de post-exposition (S6). En fin de période de post-exposition (S8), il est comparable aux valeurs mesurées avant l'exposition (T) (Figure 73).



	S2	S4	S6	S8
T	0,0079	0,0357	0,0054	ns
S2		ns	ns	ns
S4			ns	ns
S6				0,0232

**Figure 73:** *haut* : Courbe représentant le temps passé (en secondes) par les souris dans le compartiment le butanol ;  
*bas* : Tableau indiquant les différences significatives ou non significatives (ns) entre les temps passés dans le compartiment contenant le butanol en fonction des semaines.

#### c/ Test d'approche/évitement vis-à-vis de l'urine (vs eau)

L'ANOVA ne montre pas un effet semaine significatif pour l'odeur d'urine [F(4,36)=1,604 ; p=0,181]. Le temps passé par les souris dans la zone contenant l'urine de souris mâle varie de 87,1 à 107,3 secondes au cours de l'expérimentation.

#### d/ Résultats des évaluations comportementales avant, pendant et après l'exposition au CO<sub>2</sub> sur une longue durée.

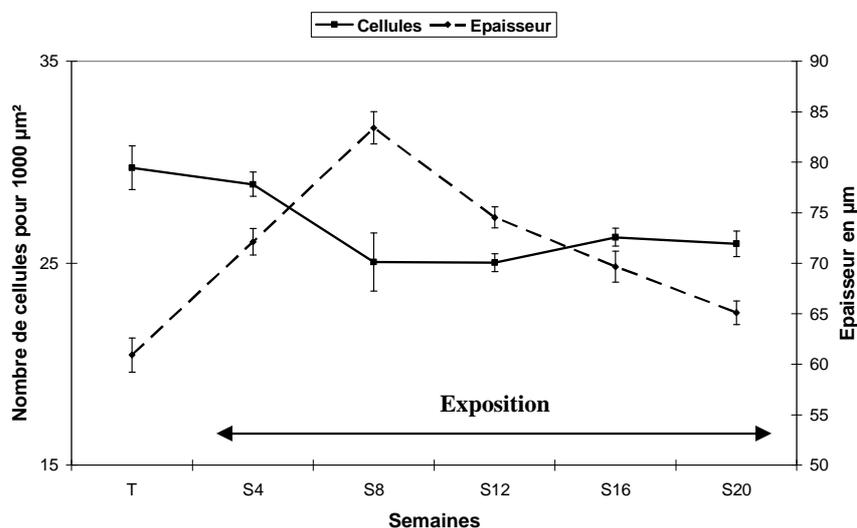
Les résultats des tests comportementaux révèlent que l'exposition au CO<sub>2</sub>(12h) entraîne des modifications du comportement des souris en augmentant l'évitement pour les odeurs de triméthylthiazoline et de butanol mais ne modifie pas le comportement des souris vis-à-vis de l'odeur d'urine de souris mâle. En effet, le temps passé dans la zone contenant le triméthylthiazoline diminue de façon significative au cours (S2/S4) et après (S6/S8) l'exposition. De même, le temps passé dans la zone contenant le butanol diminue significativement dès le début de l'exposition (S2) et jusqu'en milieu de période de post exposition (S6). Cependant, en fin de période de post exposition (S8), il est comparable aux valeurs mesurées avant l'expérimentation (T).

## II- Mesures histologiques

### 2-1- Exposition à la pyridine

#### a/ Mesures histologiques globales

Les résultats histologiques de l'exposition à la pyridine sont présentés figure 74. (Illustration II A, p128).



Epaisseur	S4	S8	S12	S16	S20
T	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,0408
S4		<0,0001	ns	ns	<0,0001
S8			<0,0001	<0,0001	<0,0001
S12				0,0061	<0,0001
S16					0,026

Cellules	S4	S8	S12	S16	S20
T	ns	<0,0001	<0,0001	0,0009	0,0003
S4		<0,0001	<0,0001	0,0035	0,001
S8			ns	ns	ns
S12				ns	ns
S16					ns

**Figure 74:** Courbes indiquant l'évolution de l'épaisseur en µm et du nombre de cellules pour une surface de 1000 µm<sup>2</sup> avant (T) et pendant (S4 à S20) l'exposition à la pyridine. Les tableaux correspondent aux résultats *post hoc* indiquant les différences significatives ou non significatives (ns) pour l'épaisseur et le nombre de cellules de l'épithélium olfactif en fonction des semaines.

#### Epaisseur de l'épithélium olfactif

L'ANOVA montre un effet semaine significatif [F(5,270)=92,584 ; p<0,0001]. Une augmentation significative et progressive de l'épaisseur est mesurée lors de la quatrième (S4) et de la huitième semaine (S8) d'exposition. De la huitième (S8) à la vingtième semaine (S20) d'exposition, l'épaisseur mesurée diminue constamment mais reste supérieure aux valeurs mesurées avant l'exposition (T) en fin d'exposition (S20).

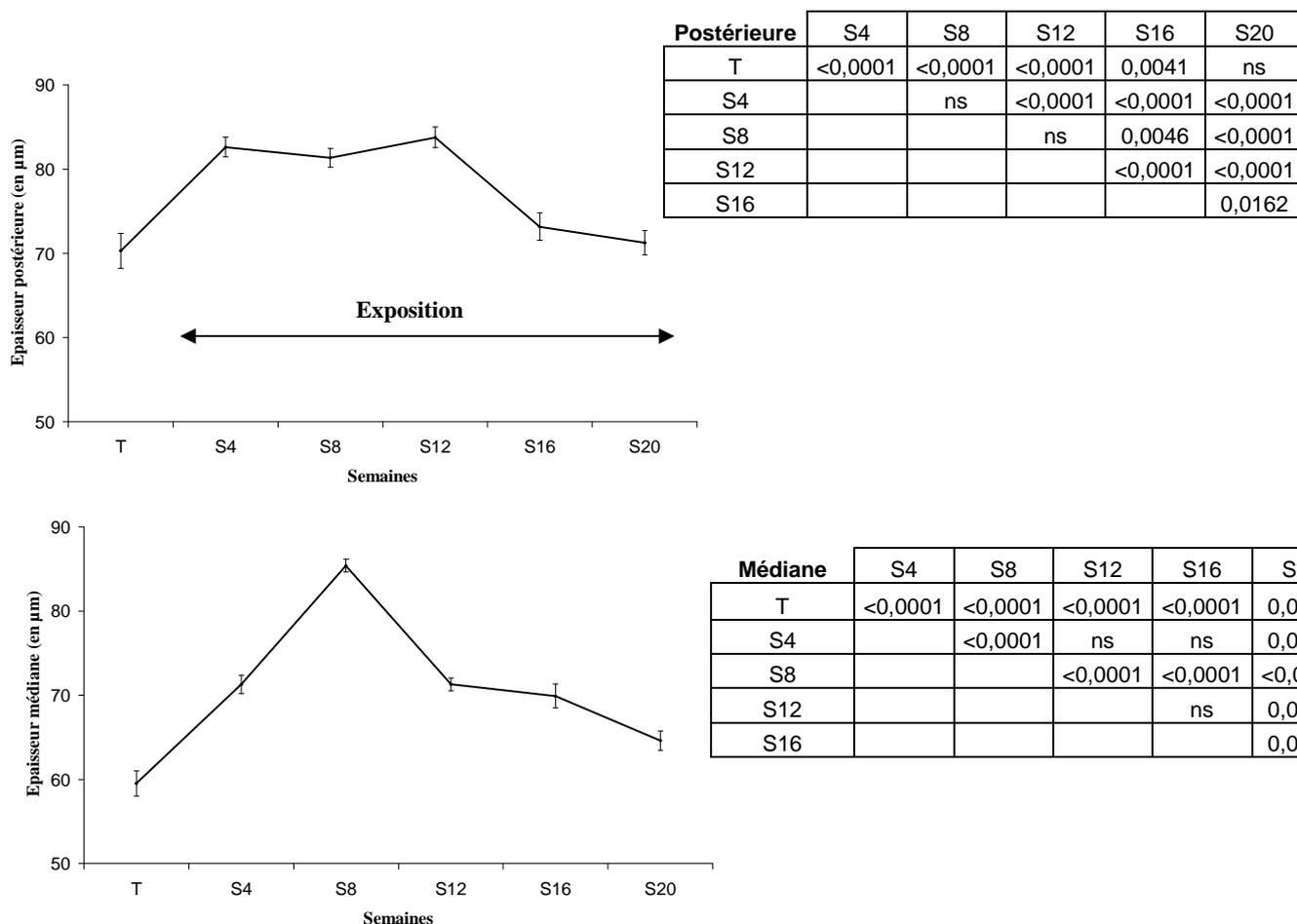
### Nombre de cellules de l'épithélium olfactif

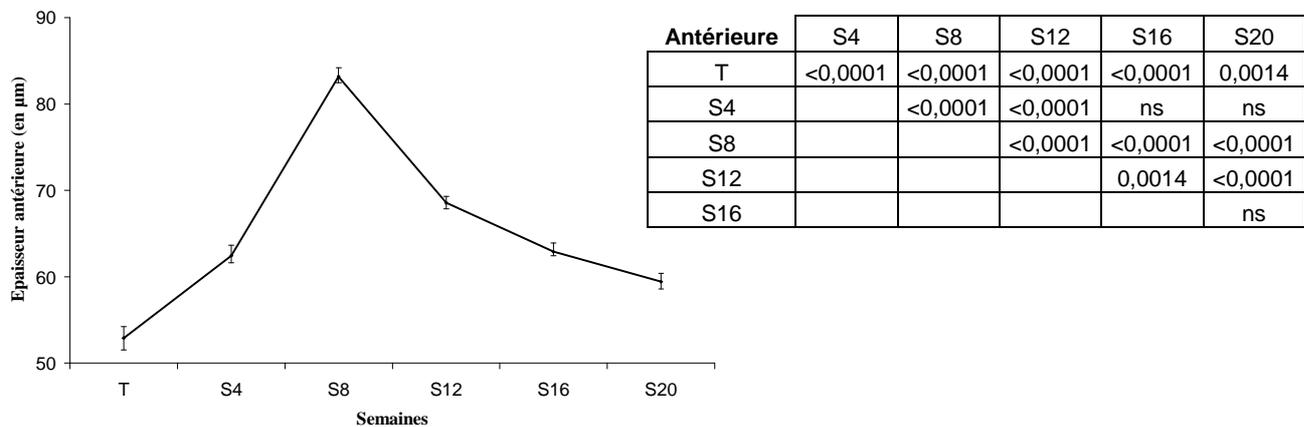
L'ANOVA montre un effet semaine significatif [ $F(5,270)=125,54$ ;  $p<0,0001$ ]. Le nombre de cellules diminue de façon significative à partir de la huitième semaine d'exposition (S8) puis reste constant. En fin d'exposition (S20), il est inférieur aux valeurs mesurées avant l'exposition (T).

### **b/ Mesures histologiques par zones de l'épithélium olfactif**

#### Épaisseur par zone de l'épithélium olfactif

L'ANOVA montre un effet semaine significatif pour l'épaisseur des zones postérieure [ $F(5,90)=16,459$ ;  $p<0,0001$ ], médiane [ $F(5,90)=69,546$ ;  $p<0,0001$ ] et antérieure [ $F(5,90)=94,658$ ;  $p<0,0001$ ] de l'épithélium olfactif (Figure 75).



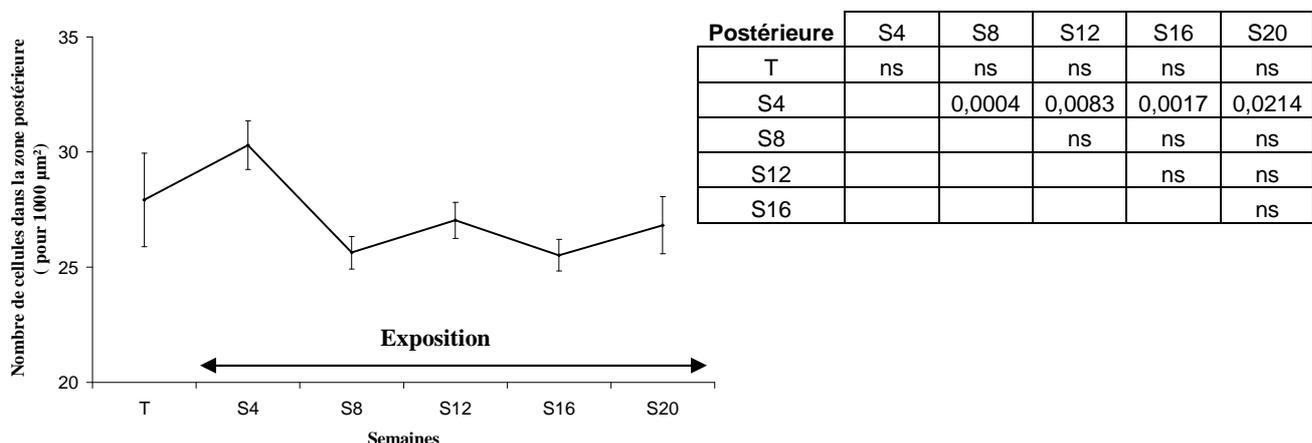


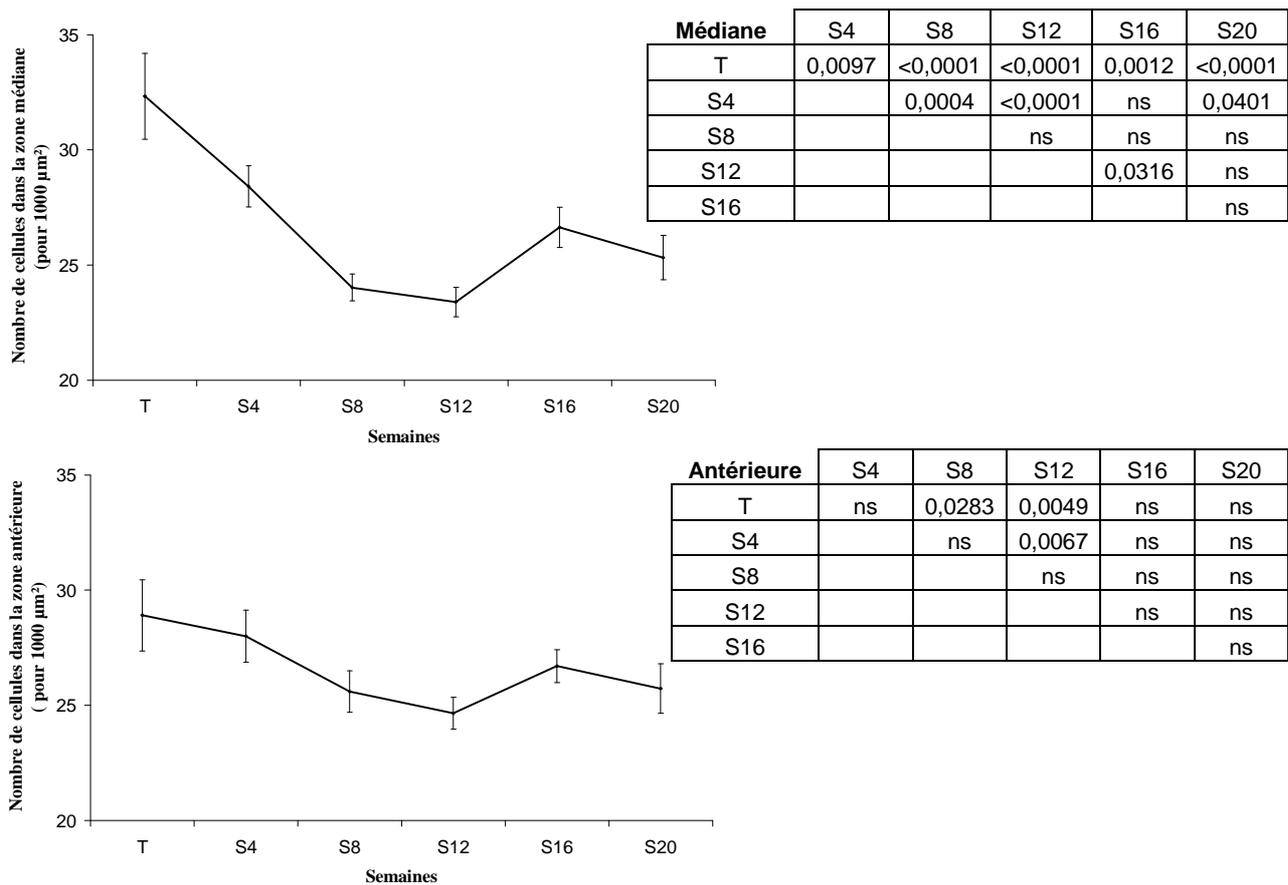
**Figure 75:** Courbes indiquant l'évolution de l'épaisseur en  $\mu\text{m}$  en fonctions des zones de l'épithélium olfactif (postérieure, médiane, antérieure) avant (T) et pendant (de S4 à S20) l'exposition à la pyridine. Les tableaux situés à droite des courbes correspondent aux résultats *post hoc* indiquant les différences significatives ou non significatives (ns).

L'épaisseur de l'épithélium olfactif augmente de façon significative pour les trois zones définies à la quatrième semaine d'exposition (S4), se stabilise pour la zone postérieure de l'épithélium olfactif et continue d'augmenter significativement jusqu'à la huitième semaine d'exposition pour les zones médiane et antérieure de l'épithélium olfactif. Dans ces deux zones, elle diminue ensuite de façon significative jusqu'à la fin de l'expérimentation, (S20). En fin d'exposition (S20), l'épaisseur de l'épithélium olfactif dans la zone postérieure est comparable à celle mesurée avant l'exposition (T), tandis qu'elle est significativement supérieure à ces valeurs dans les zones médiane et antérieure de l'épithélium olfactif.

#### Nombre de cellules par zone de l'épithélium olfactif

L'ANOVA montre un effet semaine significatif pour le nombre de cellules dans les zones postérieure  $F(5,90)=3,184$  ;  $p<0,0118$ ], médiane  $F(5,90)=11,764$  ;  $p<0,0001$ ] et antérieure  $F(5,90)=2,426$  ;  $p=0,0429$ ] de l'épithélium olfactif (Figure 76).





**Figure 76:** Courbes indiquant l'évolution du nombre de cellules de l'épithélium olfactif (pour 1000  $\mu\text{m}^2$ ) en fonction des zones de l'épithélium olfactif (postérieure, médiane, antérieure) avant (T) et pendant (de S4 à S20) l'exposition à la pyridine. Les tableaux situés à droite des courbes correspondent aux résultats *post hoc* indiquant les différences significatives ou non significatives (ns).

Le nombre de cellules de l'épithélium olfactif ne varie pas dans la zone postérieure de l'épithélium olfactif et diminue de façon significative à partir de la huitième semaine d'exposition (S8) et jusqu'à la douzième semaine d'exposition (S12) pour les zones médiane et antérieure de l'épithélium olfactif. En fin d'exposition (S20), le nombre total de cellules dans la zone médiane de l'épithélium olfactif est significativement inférieur aux valeurs mesurées avant l'exposition (T) et comparable à ces valeurs pour la zone antérieure.

### **c/ Résultats des évaluations histologiques avant, pendant et après l'exposition à la pyridine sur une longue durée.**

Les résultats montrent que l'exposition de longue durée à la pyridine (20 semaines) a pour conséquence des modifications de l'épaisseur et du nombre total de cellules de l'épithélium olfactif. En effet, à partir de la huitième semaine d'exposition (S8), une augmentation

significative de l'épaisseur et une diminution du nombre total de cellules sont mesurées. Ce nombre se stabilise ensuite et reste en fin d'expérimentation (S20) significativement inférieur aux valeurs mesurées avant l'exposition (T). En revanche, l'épaisseur de l'épithélium olfactif diminue de façon significative à partir de la huitième semaine d'exposition (S8) mais reste supérieure aux valeurs mesurées avant l'exposition (T) en fin d'expérimentation (S20).

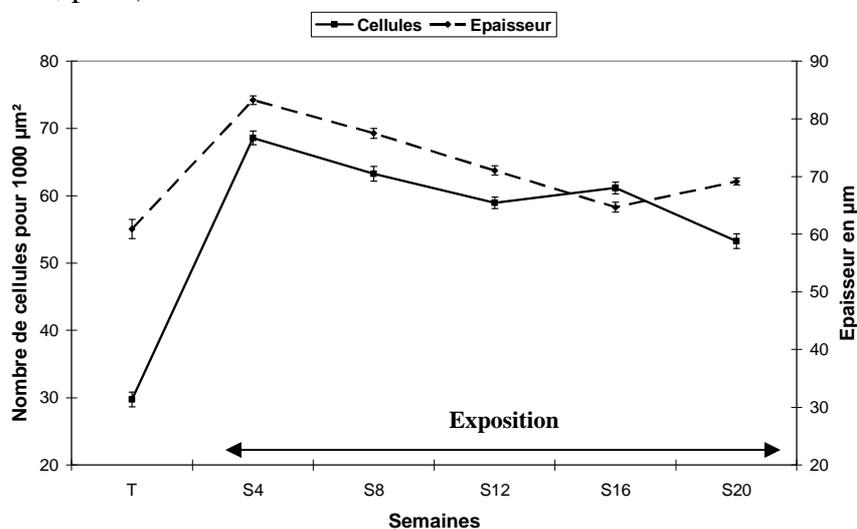
Concernant l'épaisseur par zones de l'épithélium olfactif, elle augmente de façon significative pour les trois zones définies à la quatrième semaine d'exposition (S4), se stabilise pour la zone postérieure de l'épithélium olfactif et continue d'augmenter significativement jusqu'à la huitième semaine d'exposition pour les zones médiane et antérieure de l'épithélium olfactif. Dans ces deux zones, elle diminue ensuite de façon significative jusqu'à la fin de l'expérimentation, (S20). En fin d'exposition (S20), l'épaisseur de l'épithélium olfactif dans la zone postérieure est comparable à celle mesurée avant l'exposition (T), tandis qu'elle est significativement supérieure à ces valeurs dans les zones médiane et antérieure de l'épithélium olfactif.

Concernant le nombre total de cellules par zones de l'épithélium olfactif, alors que le nombre ne varie pas dans la zone postérieure de l'épithélium olfactif, il diminue de façon significative à partir de la huitième semaine d'exposition (S8) et jusqu'à la douzième semaine d'exposition (S12) pour les zones médiane et antérieure de l'épithélium olfactif. En fin d'exposition (S20), le nombre total de cellules dans la zone médiane de l'épithélium olfactif est significativement inférieur aux valeurs mesurées avant l'exposition (T) et comparable à ces valeurs pour la zone antérieure.

## 2-2- Exposition au toluène

### a/ Mesures histologiques globales

Les résultats histologiques de l'exposition au toluène sont présentés figure 77. (Illustration II B, p128).



Cellules	S4	S8	S12	S16	S20
T	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
S4		0,0003	<0,0001	<0,0001	<0,0001
S8			0,0108	ns	<0,0001
S12				ns	ns
S16					0,0015

Epaisseur	S4	S8	S12	S16	S20
T	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,0064	<0,0001
S4		<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
S8			<0,0001	<0,0001	<0,0001
S12				<0,0001	ns
S16					0,0019

**Figure 77:** Courbes indiquant l'évolution de l'épaisseur en µm et du nombre de cellules pour une surface de 1000 µm<sup>2</sup> avant (T) et pendant (S4 à S20) l'exposition au toluène. Les tableaux correspondent aux résultats *post hoc* indiquant les différences significatives ou non significatives (ns) pour l'épaisseur et le nombre de cellules de l'épithélium olfactif en fonction des semaines.

#### Epaisseur de l'épithélium olfactif

L'ANOVA montre un effet semaine significatif [F(5,270)=84,483 ; p<0,0001]. L'épaisseur de l'épithélium olfactif augmente significativement lors de la quatrième semaine d'exposition (S4). Elle diminue ensuite progressivement de la quatrième (S4) à la seizième semaine d'exposition (S16). En fin d'exposition (S20), l'épaisseur est supérieure à celle mesurée avant l'exposition (T).

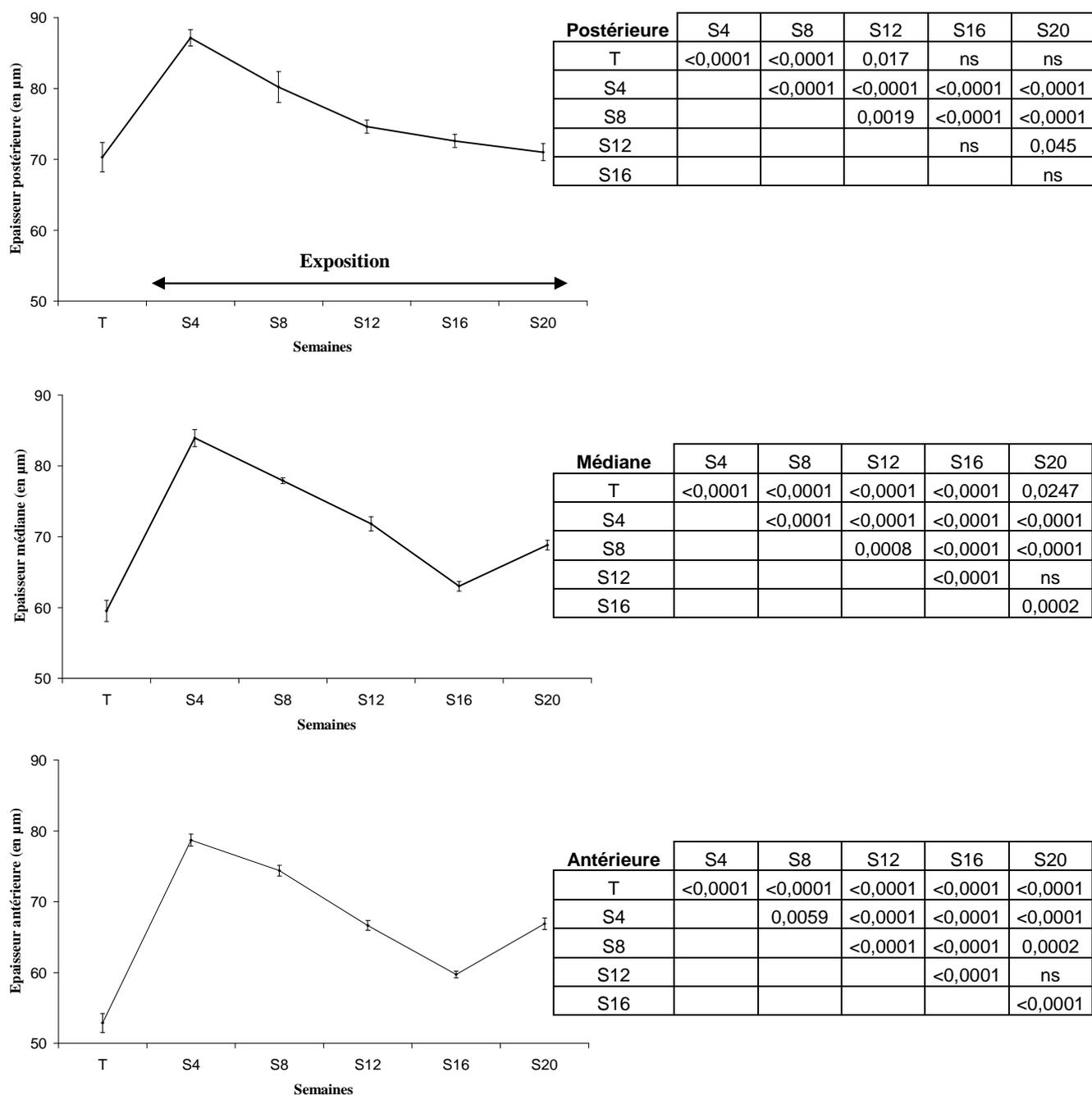
#### Nombre de cellules de l'épithélium olfactif

L'ANOVA montre un effet semaine significatif [F(5,270)=151,725 ; p<0,0001]. Le nombre de cellules augmente de façon significative lors de la quatrième semaine d'exposition (S4), puis diminue progressivement jusqu'à la douzième semaine d'exposition (S12). En fin d'exposition (S20), il est supérieur aux valeurs mesurées avant l'exposition (T).

## b/ Mesures histologiques par zones de l'épithélium olfactif

### Épaisseur par zone de l'épithélium olfactif

L'ANOVA montre un effet semaine significatif pour l'épaisseur des zones postérieure [F(5,90)=27,561 ; p<0,0001], médiane F(5,90)=89,12 ; p<0,0001] et antérieure F(5,90)=14,21 ; p<0,0001] de l'épithélium olfactif (Figure 78).

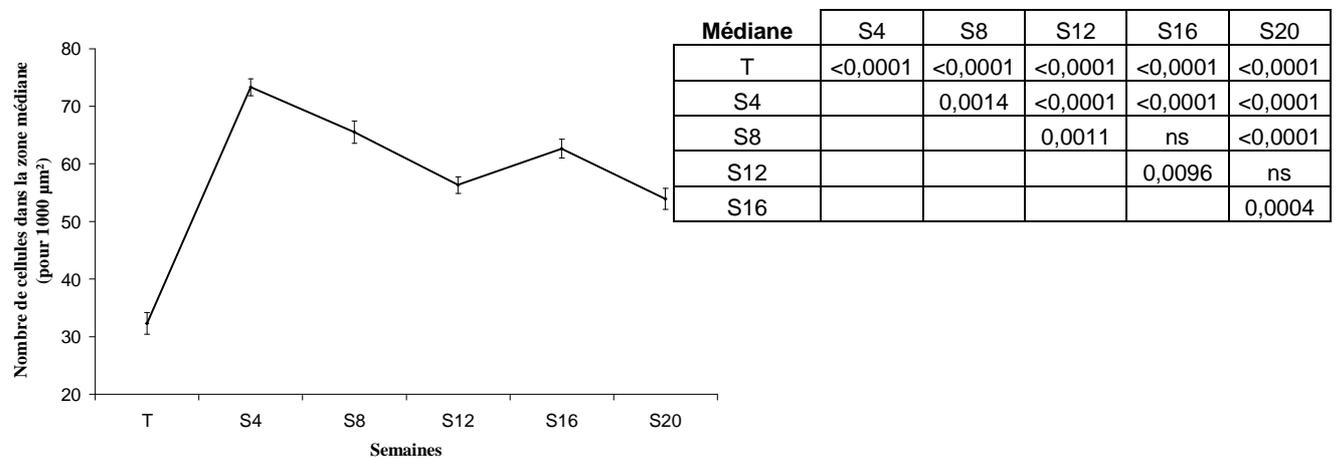
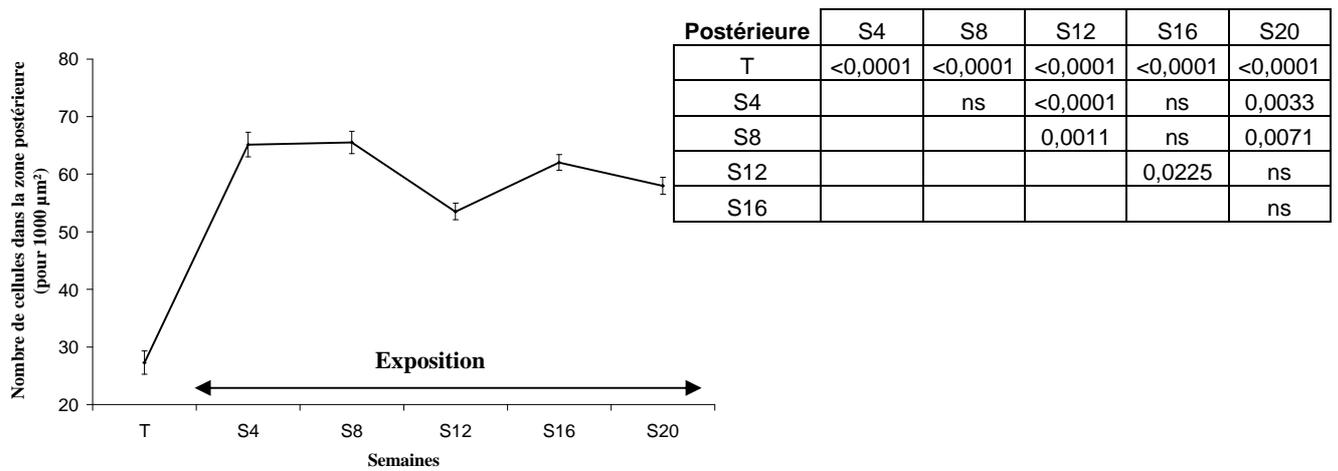


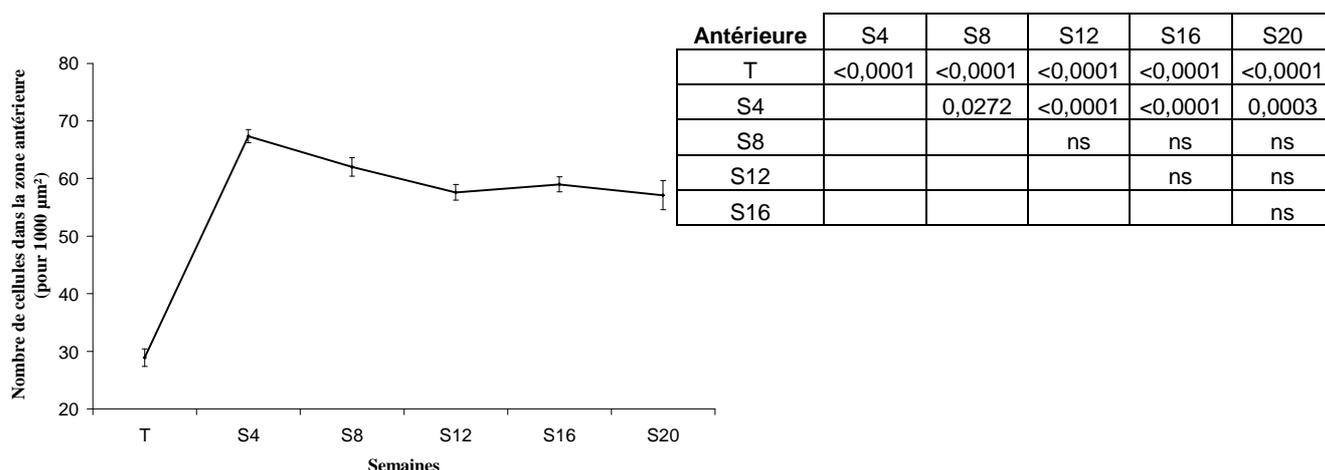
**Figure 78:** Courbes indiquant l'évolution de l'épaisseur en µm en fonctions des zones de l'épithélium olfactif (postérieure, médiane, antérieure) avant (T) et pendant (de S4 à S20) l'exposition au toluène. Les tableaux situés à droite des courbes correspondent aux résultats *post hoc* indiquant les différences significatives ou non significatives (ns).

Pour les trois zones définies, une augmentation significative de l'épaisseur de l'épithélium olfactif est observée à la quatrième semaine d'exposition (S4) suivie d'une diminution significative jusqu'en fin d'expérimentation (S20) pour la zone postérieure, et jusqu'à la seizième semaine d'exposition (S16) pour les zones médiane et antérieure. Dans ces zones, une augmentation significative de l'épaisseur de l'épithélium est observée en fin d'expérimentation (S20), les valeurs étant significativement supérieures à celles mesurées avant l'exposition (T). En revanche, l'épaisseur de l'épithélium olfactif dans la zone postérieure est comparable aux valeurs mesurées avant l'exposition en fin d'expérimentation (S20).

Nombre de cellules par zone de l'épithélium olfactif

L'ANOVA montre un effet semaine significatif pour le nombre de cellules dans les zones postérieure F(5,90)=47,861 ; p<0,0001], médiane F(5,90)=59,981 ; p=0,0082] et antérieure F(5,90)=73,838 ; p=0,0008] de l'épithélium olfactif (Figure 79).





**Figure 79:** Courbes indiquant l'évolution du nombre de cellules de l'épithélium olfactif (pour 1000  $\mu\text{m}^2$ ) en fonctions des zones de l'épithélium olfactif (postérieure, médiane, antérieure) avant (T) et pendant (de S4 à S20) l'exposition au toluène. Les tableaux situés à droite des courbes correspondent aux résultats *post hoc* indiquant les différences significatives ou non significatives (ns).

Une augmentation significative du nombre de cellules est mesurée à la quatrième semaine d'exposition (S4), suivie d'une stabilisation ou d'une légère diminution est mesurée pour les trois zones définies. En fin d'expérimentation (S20), le nombre total de cellules dans les trois zones de l'épithélium olfactif est supérieur aux valeurs du témoin (T).

### c/ Résultats des évaluations histologiques avant, pendant et après l'exposition au toluène sur une longue durée.

Les résultats indiquent que l'exposition au toluène a pour conséquence des modifications de l'épaisseur et du nombre total de cellules de l'épithélium olfactif qui suivent la même dynamique au cours de l'expérimentation. En effet, à partir de la quatrième semaine d'exposition (S4), une augmentation significative de l'épaisseur ainsi que du nombre total de cellules de l'épithélium olfactif est mesurée. Les valeurs de ces paramètres diminuent ensuite significativement. En fin d'expérimentation (S20), l'épaisseur et le nombre de cellules de l'épithélium olfactif sont significativement supérieurs aux valeurs mesurées avant l'exposition (T).

Concernant l'épaisseur par zone de l'épithélium olfactif, pour les trois zones définies, une augmentation est observée à la quatrième semaine d'exposition (S4) suivie d'une diminution significative jusqu'en fin d'expérimentation (S20) pour la zone postérieure, et jusqu'à la seizième semaine d'exposition (S16) pour les zones médiane et antérieure. Dans

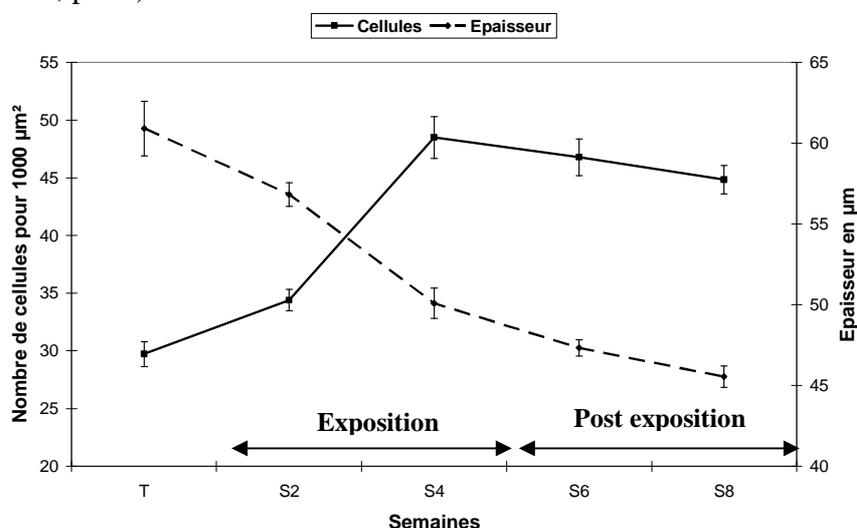
ces zones, une augmentation significative de l'épaisseur de l'épithélium est observée en fin d'expérimentation (S20), les valeurs étant significativement supérieures à celles mesurées avant l'exposition (T). En revanche, l'épaisseur de l'épithélium olfactif dans la zone postérieure est comparable aux valeurs mesurées avant l'exposition en fin d'expérimentation (S20).

Concernant le nombre total de cellules par zone de l'épithélium olfactif, une augmentation significative à la quatrième semaine d'exposition (S4), suivie d'une stabilisation ou d'une légère diminution est mesurée pour les trois zones définies. En fin d'expérimentation (S20), le nombre total de cellules dans les trois zones de l'épithélium olfactif est supérieur aux valeurs du témoin (T).

## 2-3- Exposition au CO<sub>2</sub> (12h)

### a/ Mesures histologiques globales

Les résultats histologiques de l'exposition CO<sub>2</sub> (12h) sont présentés figure 80. (Illustration II C, p128).



Cellules	S2	S4	S6	S8
T	0,0111	<0,0001	<0,0001	<0,0001
S2		<0,0001	<0,0001	<0,0001
S4			ns	ns
S6				ns

Epaisseur	S2	S4	S6	S8
T	0,0144	<0,0001	<0,0001	<0,0001
S2		0,0004	<0,0001	<0,0001
S4			ns	0,0145
S6				ns

**Figure 80:** Courbes indiquant l'évolution de l'épaisseur en µm et du nombre de cellules pour une surface de 1000 µm<sup>2</sup> avant (T), pendant (S2, S4) et après (S6, S8) l'exposition au CO<sub>2</sub> (12h). Les tableaux correspondent aux résultats *post hoc* indiquant les différences significatives ou non significatives (ns) pour l'épaisseur et le nombre de cellules de l'épithélium olfactif en fonction des semaines.

#### Epaisseur de l'épithélium olfactif

L'ANOVA montre un effet semaine significatif [F(4,216)=32,544 ; p<0,0001]. L'épaisseur de l'épithélium olfactif diminue de façon significative et progressivement au cours de l'exposition (S2/S4), et se stabilise en milieu de période de post-exposition (S6). En fin de période de post-exposition (S8), elle est inférieure à celle mesurée avant l'exposition (T).

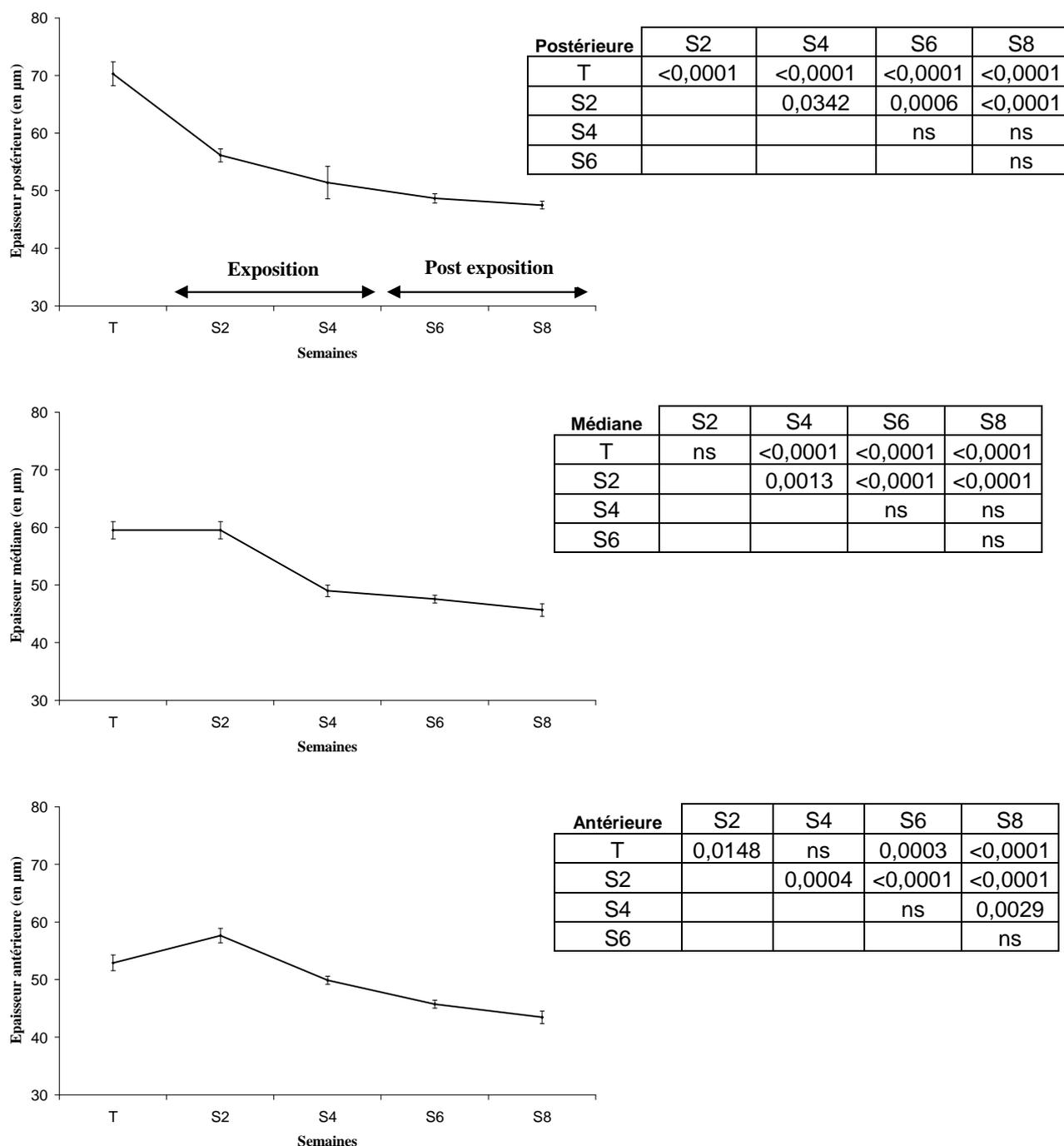
#### Nombre de cellules de l'épithélium olfactif

L'ANOVA montre un effet semaine significatif [F(4,216)=42,649 ; p<0,0001]. Le nombre de cellules augmente significativement et progressivement au cours de la période d'exposition (S2/S4) et se stabilise lors de la période de post-exposition (S6/S8). En fin de période de post-exposition (S8), il est supérieur à celui mesuré avant l'exposition (T).

## b/ Mesures histologiques par zones de l'épithélium olfactif

### Épaisseur par zone de l'épithélium olfactif

L'ANOVA montre un effet semaine significatif pour l'épaisseur des zones postérieure [F(4,72)=33,759 ; p<0,0001], médiane F(4,72)=23,68 ; p<0,0001] et antérieure F(4,72)=22,543 ; p<0,0001] de l'épithélium olfactif (Figure 81).

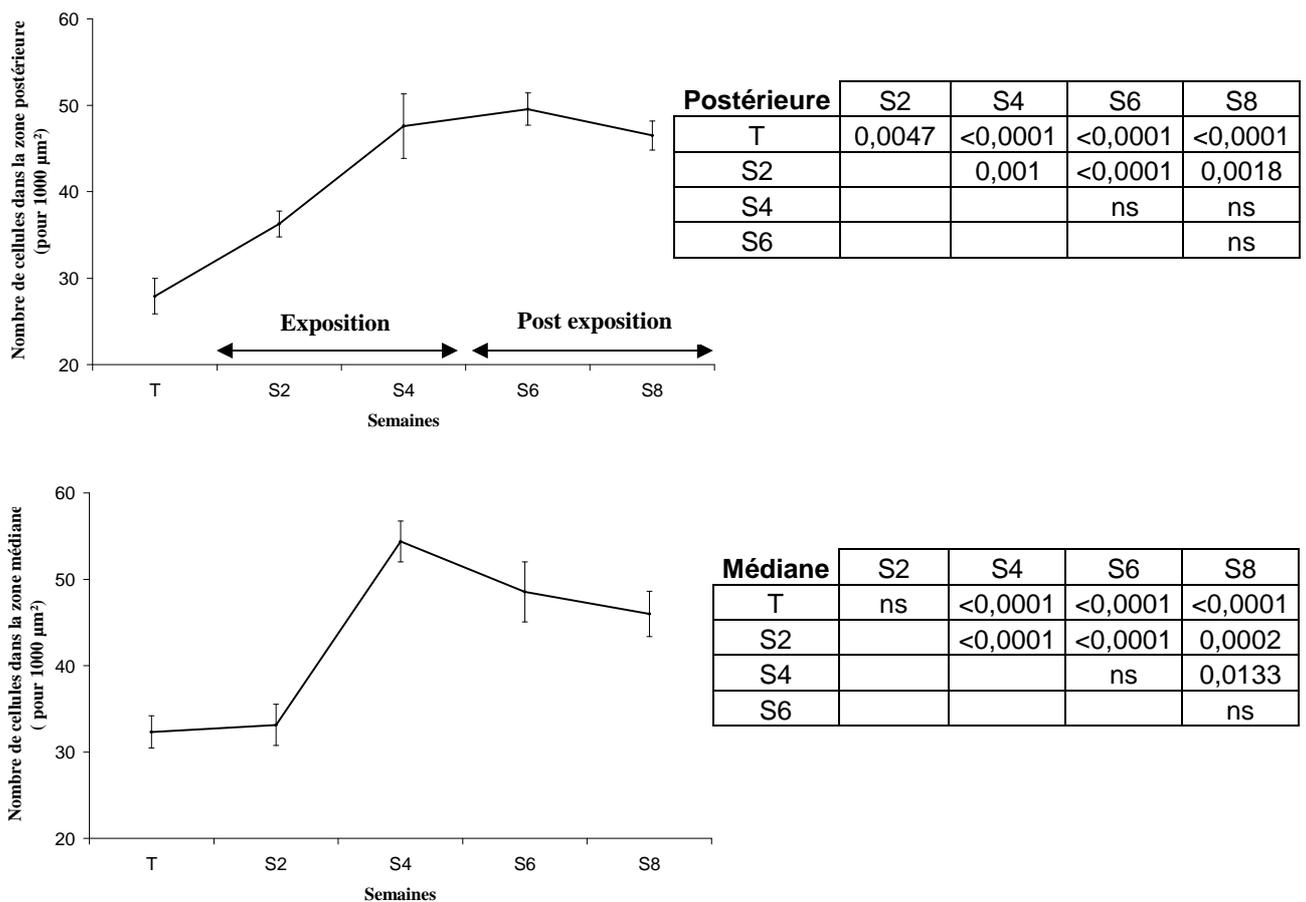


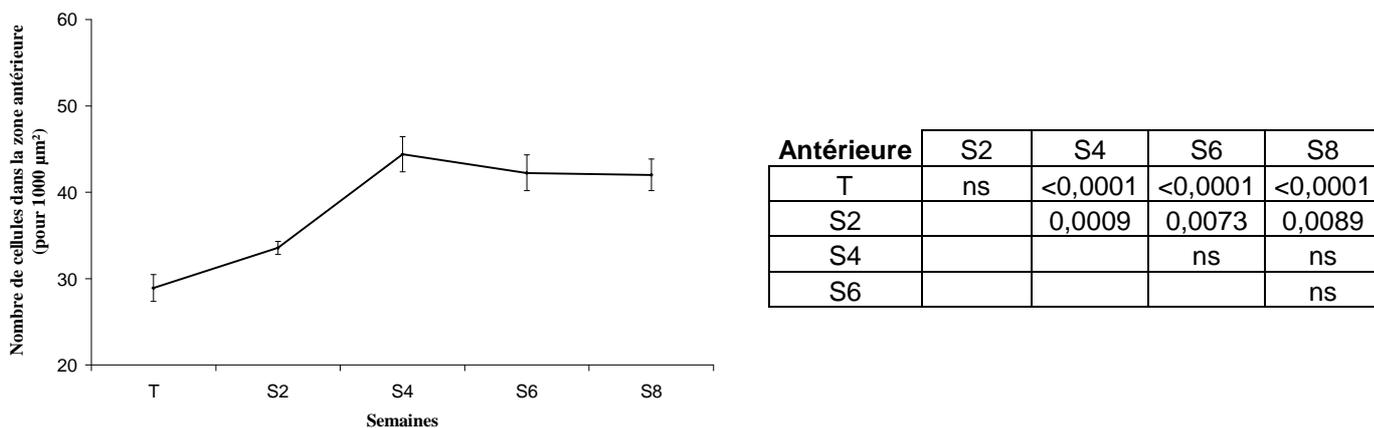
**Figure 81:** Courbes indiquant l'évolution de l'épaisseur en µm en fonction des zones de l'épithélium olfactif (postérieure, médiane, antérieure) avant (T), pendant (S4 et S6) et après (S6 et S8) l'exposition au CO<sub>2</sub> (12h). Les tableaux situés à droite des courbes correspondent aux résultats *post hoc* indiquant les différences significatives ou non significatives (ns).

Des variations de l'épaisseur de l'épithélium olfactif sont observées lors de la deuxième semaine d'exposition (S2) : l'épaisseur diminue de façon significative dans la zone postérieure, est stable dans la zone médiane, et augmente de façon significative dans la zone antérieure. Pour les trois zones définies, une diminution de l'épaisseur est mesurée lors de la phase de post-exposition (S6/S8). En fin d'exposition (S8), l'épaisseur de l'épithélium olfactif dans les trois zones est significativement inférieure aux mesurées avant l'exposition (T).

Nombre de cellules par zone de l'épithélium olfactif

L'ANOVA montre un effet semaine significatif pour le nombre de cellules dans les zones postérieure  $F(4,72)=20,142$  ;  $p<0,0001$ ], médiane  $F(4,72)=14,661$  ;  $p<0,0001$ ] et antérieure  $F(4,72)=16,554$  ;  $p<0,0001$ ] de l'épithélium olfactif (Figure 82).





**Figure 82:** Courbes indiquant l'évolution du nombre de cellules de l'épithélium olfactif (pour 1000  $\mu\text{m}^2$ ) en fonction des zones de l'épithélium olfactif (postérieure, médiane, antérieure) avant (T), pendant (S2 et S4) et après (S6 et S8) l'exposition au  $\text{CO}_2$  (12h). Les tableaux situés à droite des courbes correspondent aux résultats *post hoc* indiquant les différences significatives ou non significatives (ns).

Une augmentation significative du nombre de cellules est mesurée en fin d'exposition (S4) suivie d'une stabilisation en phase de post exposition (S6/S8) pour les trois zones définies. En fin d'expérimentation (S8), le nombre total de cellules par zone est significativement supérieur aux valeurs mesurées avant l'exposition (T) pour les trois zones.

### c/ Résultats des évaluations histologiques avant, pendant et après l'exposition au $\text{CO}_2$ sur une longue durée.

Les résultats montrent que l'exposition au  $\text{CO}_2$  sur une longue durée a pour conséquence des évolutions inverses de l'épaisseur et du nombre total de cellules de l'épithélium olfactif.

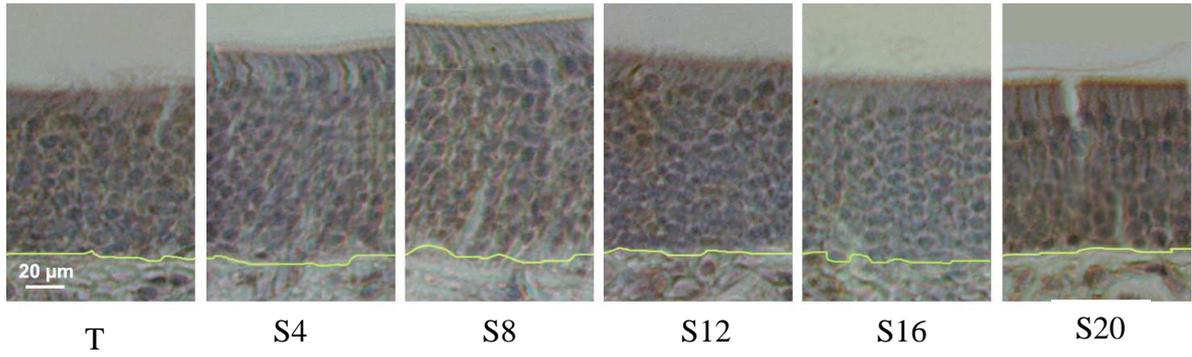
L'épaisseur de l'épithélium olfactif diminue de façon significative et régulière du début à la fin de la période de post-exposition (S8), tandis que le nombre total de cellules augmente de façon significative pendant la phase d'exposition (S2/S4) puis se stabilise lors de la phase de post-exposition (S6/S8). En fin d'expérimentation (S8), l'épaisseur de l'épithélium olfactif est significativement inférieure aux valeurs mesurées avant l'exposition (T), alors que le nombre total de cellules est significativement supérieur à ces valeurs.

Concernant l'épaisseur de l'épithélium olfactif par zones, des variations sont observées lors de la deuxième semaine d'exposition (S2) : l'épaisseur diminue de façon significative dans la zone postérieure, est stable dans la zone médiane, et augmente de façon significative

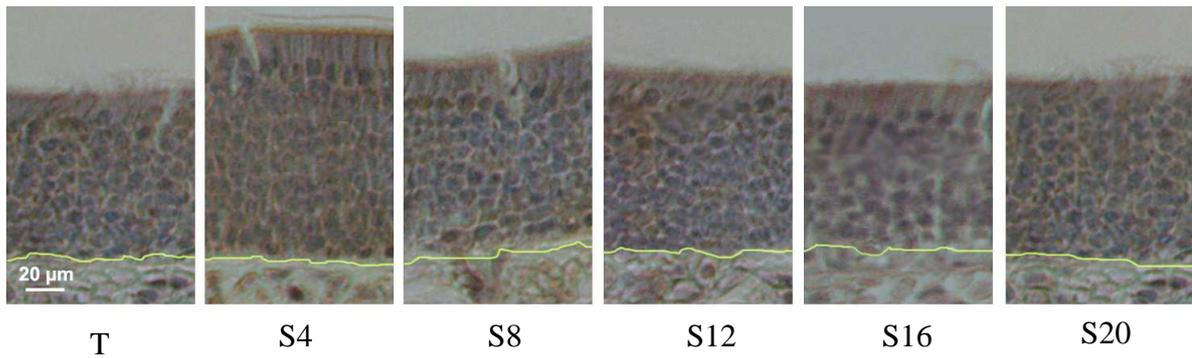
dans la zone antérieure. Pour les trois zones définies, une diminution de l'épaisseur est mesurée lors de la phase de post-exposition (S6/S8). En fin d'exposition (S8), l'épaisseur de l'épithélium olfactif dans les trois zones est significativement inférieure aux mesurées avant l'exposition (T).

Concernant le nombre total de cellules par zone de l'épithélium olfactif, une augmentation significative en fin d'exposition (S4) suivie d'une stabilisation en phase de post exposition (S6/S8) est mesurée pour les trois zones définies. En fin d'expérimentation (S8), le nombre total de cellules par zone est significativement supérieur aux valeurs mesurées avant l'exposition (T) pour les trois zones.

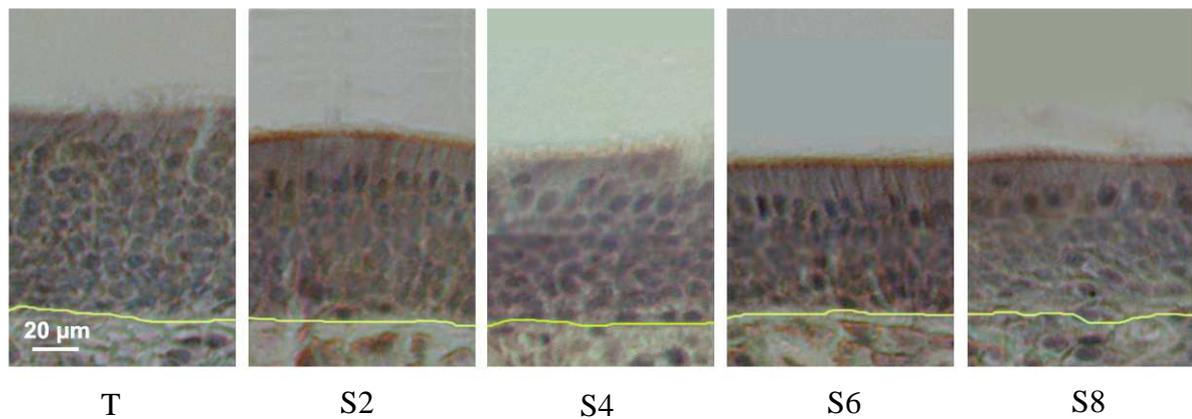
**A. Exposition à la pyridine**



**B. Exposition au toluène**



**C. Exposition au CO<sub>2</sub> (12h)**



**Illustration II:** Aspect histologique de l'épithélium olfactif des souris avant (T) et pendant (S4 à S20) l'exposition à la pyridine et au toluène ; avant (T), pendant (S2/S4) et après (S6/S8) l'exposition au CO<sub>2</sub> (12h). Coloration nucléaire à l'hématoxyline de Harris. Grossissement x40. La lame basale est indiquée par un trait de couleur jaune.

- A : Exposition à la pyridine
- B : Exposition au toluène
- C : Exposition au CO<sub>2</sub> (12h)

### III- Récapitulatif des résultats obtenus lors des expositions de longue durée

La figure 83 récapitule les résultats des tests comportementaux mesurés suite aux diverses expositions. Les augmentations ( $\nearrow$ ), ou les absences de modification ( $\emptyset$ ) du comportement d'approche/évitement des souris par rapport aux valeurs mesurées avant l'exposition (T) pour les substances testées sont indiquées (ne : données non évaluées).

<b>Evitement par rapport à</b> <i>Expositions de longue durée</i>	<b>la substance d'exposition</b>	<b>Butanol</b>	<b>Urine</b>	<b>TMT</b>
<b>Pyridine (50 ppm)</b>	temporaire	$\emptyset$	$\nearrow$	ne
<b>Toluène (260 ppm)</b>	$\nearrow$	périodique	$\emptyset$	ne
<b>CO<sub>2</sub> (12h) (3%)</b>	ne	$\nearrow$	$\emptyset$	$\nearrow$

**Figure 83 :** Récapitulatif des résultats comportementaux obtenus lors des expositions de longue durée (TMT : triméthylthiazoline).

Les résultats des tests comportementaux permettent de conclure que l'exposition à la pyridine modifie temporairement le comportement d'évitement des souris vis-à-vis de l'odeur de pyridine, tandis que l'exposition au toluène a pour conséquence une augmentation durable de l'évitement des souris pour l'odeur de toluène à partir de la dixième semaine d'exposition. De plus, l'exposition à la pyridine n'entraîne pas de modification du comportement des souris vis-à-vis de l'odeur butanol, et une diminution durable de l'approche pour l'odeur d'urine de souris mâle est mesurée dès la deuxième semaine d'exposition. Les modifications inverses sont observées lors de l'exposition au toluène : cette exposition n'altère pas le comportement d'approche des souris pour l'odeur d'urine et une augmentation périodique de l'évitement pour l'odeur de butanol est mesurée toutes les trois à quatre semaines. Comme pour le toluène, l'exposition au CO<sub>2</sub> sur une longue durée altère le comportement d'évitement des souris pour l'odeur de butanol. De plus, elle augmente de façon durable l'évitement des souris pour l'odeur de triméthylthiazoline, puisque ce phénomène est observé jusqu'en fin d'expérimentation. En revanche, elle ne modifie pas le comportement d'approche des souris pour l'odeur d'urine.

La figure 84 récapitule les résultats des mesures histologiques (épaisseur et nombre total de cellules) réalisées en fonction des différents produits d'exposition, et suivant la durée d'exposition. Les augmentations (↗), les diminutions (↘) ou les stabilisations (≈) de l'épaisseur de l'épithélium olfactif et du nombre de cellules sont indiquées par rapport aux valeurs mesurées avant l'exposition (T).

	Période d'exposition									
	S4		S8		S12		S16		S20	
	Epaiss.	Nombre de cellules	Epaiss.	Nombre de cellules	Epaiss.	Nombre de cellules	Epaiss.	Nombre de cellules	Epaiss.	Nombre de cellules
<i>Expositions de longue durée</i>										
<b>Pyridine (50 ppm)</b>	↗	≈	↗	↘	↗	↘	↗	↘	↗	↘
<b>Toluène (260 ppm)</b>	↗	↗	↗	↗	↗	↗	↗	↗	↗	↗
	Période d'exposition					Période post exposition				
	S2		S4		S6		S8			
<b>CO<sub>2</sub> (12h) (3%)</b>	↘	↗	↘	↗	↘	↗	↘	↗		

**Figure 84:** Récapitulatif des résultats histologiques (épaisseur et nombre de cellules de l'épithélium olfactif) obtenus lors des expositions de longue durée.

Les résultats des mesures histologiques soulignent des atteintes variables de l'épithélium olfactif en fonction de la molécule d'exposition. Le nombre total de cellules de l'épithélium olfactif est toujours supérieur aux valeurs mesurées avant l'exposition lors des expositions au toluène et au CO<sub>2</sub>(12h), tandis qu'il diminue lors de l'exposition à la pyridine. Pour les expositions à la pyridine et au toluène, une augmentation de l'épaisseur est mesurée dans les premières semaines d'exposition, puis une diminution ou une stabilisation est ensuite observée, l'épaisseur restant cependant supérieure aux valeurs du témoin. En revanche, l'évolution du nombre total de cellules dans l'épithélium olfactif ne suit pas la même dynamique lors de ces deux expositions, puisqu'il diminue lors de l'exposition à la pyridine et augmente lors de l'exposition au toluène.

La figure 85 récapitule les résultats des mesures histologiques réalisées sur les trois zones (postérieure, médiane, antérieure) de l'épithélium olfactif en fonction produits d'exposition, et suivant la durée d'exposition. Les augmentations (↗), les diminutions (↘) ou les stabilisations (≈) de l'épaisseur de l'épithélium olfactif et du nombre total de cellules sont indiquées par rapport aux valeurs obtenues avant l'exposition (T).

<b>A : Épaisseur</b>	<b>Période d'exposition</b>														
	<b>S4</b>			<b>S8</b>			<b>S12</b>			<b>S16</b>			<b>S20</b>		
<i>Expositions de longue durée</i>	post	med	ant	post	med	ant	post	med	ant	post	med	ant	post	med	ant
<b>Pyridine (50 ppm)</b>	↗	↗	↗	↗	↗	↗	↗	↗	↗	↗	↗	↗	≈	↗	↗
<b>Toluène (260 ppm)</b>	↗	↗		↗	↗	↗	↗	↗	↗	≈	↗	↗	≈	↗	↗
	<b>Période d'exposition</b>						<b>Période de post exposition</b>								
	<b>S2</b>			<b>S4</b>			<b>S6</b>			<b>S8</b>					
<b>CO<sub>2</sub>(12h) 3%</b>	↘	≈	↗	↘	↘	≈	↘	↘	↘	↘	↘	↘	↘	↘	↘

<b>B : Nombre de cellule</b>	<b>Période d'exposition</b>														
	<b>S4</b>			<b>S8</b>			<b>S12</b>			<b>S16</b>			<b>S20</b>		
<i>Expositions de longue durée</i>	post	med	ant	post	med	ant	post	med	ant	post	med	ant	post	med	ant
<b>Pyridine (50 ppm)</b>	≈	↘	≈	≈	↘	↘	≈	↘	↘	≈	↘	≈	≈	↘	≈
<b>Toluène (260 ppm)</b>	↗	↗	↗	↗	↗	↗	↗	↗	↗	↗	↗	↗	↗	↗	↗
	<b>Période d'exposition</b>						<b>Période de post exposition</b>								
	<b>S2</b>			<b>S4</b>			<b>S6</b>			<b>S8</b>					
<b>CO<sub>2</sub>(12h) 3%</b>	↗	≈	≈	↗	↗	↗	↗	↗	↗	↗	↗	↗	↗	↗	↗

**Figure 85:** Récapitulatif des résultats histologiques obtenus lors des expositions de longue durée en fonction des zones de l'épithélium olfactif (postérieure, médiane, antérieure).

**A :** épaisseur/ **B :** nombre total de cellules de l'épithélium olfactif

Les résultats histologiques mesurés sur les zones de l'épithélium olfactif indiquent que les expositions de longue durée affectent l'épaisseur et le nombre total de cellules dans les trois zones définies (postérieure, médiane et antérieure).

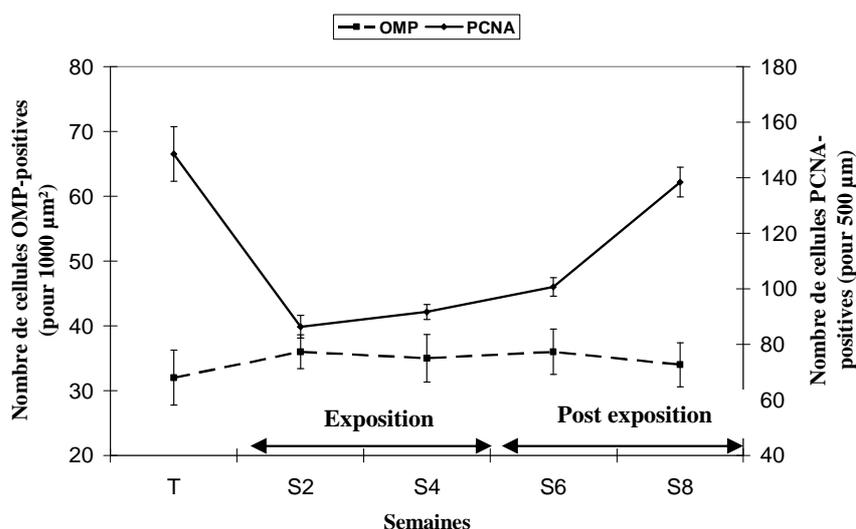
Les cinétiques de nombre de cellules et d'épaisseur de l'épithélium olfactif suivent la même évolution pour chacune des zones lors de l'exposition au toluène, alors qu'elles diffèrent lors des expositions à la pyridine et au CO<sub>2</sub>(12h). En effet, l'augmentation de l'épaisseur de l'épithélium olfactif lors de l'exposition à la pyridine est associée à une diminution du nombre total de cellules, en particulier dans les zones médiane et antérieure de l'épithélium olfactif. L'épaisseur de l'épithélium olfactif diminue dans les trois zones définies dès le milieu de l'exposition au CO<sub>2</sub>(12h), et en parallèle, une augmentation du nombre total de cellules et mesurée dans les trois zones de l'épithélium olfactif.

**Partie 4 : Mesures immunohistochimiques sur l'épithélium olfactif principal de souris soumis à une exposition à des polluants.**

## I- Expositions de courte durée

### 1-1- Exposition à l'acétone

Les résultats sont présentés figure 86 (Illustration III A, p136). L'ANOVA montre un effet semaine non significatif pour le nombre de neurones olfactifs matures, marqués par l'OMP, et significatif pour le nombre de cellules en division, marquées par le PCNA [ $F(4,36)= 24,495$ ;  $p<0,0001$ ].



PCNA	S2	S4	S6	S8
T	<0,0001	<0,0001	<0,0001	ns
S2		ns	ns	<0,0001
S4			ns	<0,0001
S6				<0,0001

**Figure 86:** Courbes indiquant l'évolution du nombre de cellules OMP-positives pour une surface de 1000 µm<sup>2</sup> et du nombre de cellules PCNA-positives pour une longueur de 500 µm, avant (T), pendant (S2 et S4) et après (S6 et S8) l'exposition à l'acétone. Le tableau correspond aux résultats *post hoc* indiquant les différences significatives ou non significatives (ns) pour le nombre de cellules PCNA-positives en fonction des semaines.

#### Neurones olfactifs matures

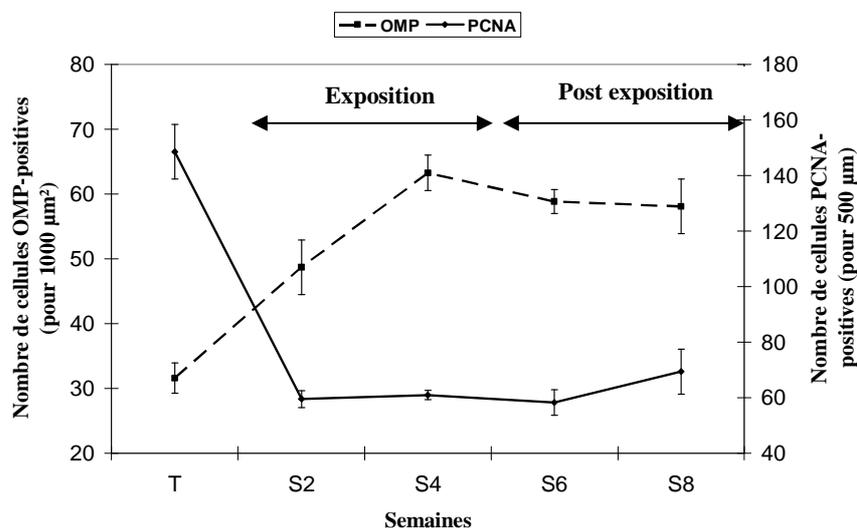
Le nombre de cellules OMP-positives ne varie pas significativement au cours de l'expérimentation.

#### Cellules en division

Dès la deuxième semaine d'exposition (S2), le nombre de cellules PCNA-positives diminue significativement. Ce nombre reste relativement constant en fin d'exposition (S4) et jusqu'en milieu de période post exposition (S6). Il augmente significativement en fin d'expérimentation (S8) pour retourner à des valeurs proches de celles mesurées avant l'exposition (T).

## 1-2- Exposition à la pyridine

Les résultats sont présentés figure 87 (Illustration III B, p136). L'ANOVA montre un effet semaine significatif pour le nombre de neurones olfactifs matures, marqués par l'OMP [F(4,36)=16,896 ; p<0,0001] et le nombre de cellules en division, marquées par le PCNA [F(4,36)=28,897 ; p<0,0001].



OMP	S2	S4	S6	S8
T	0,0009	<0,0001	<0,0001	<0,0001
S2		0,0025	0,0322	ns
S4			ns	ns
S6				ns

PCNA	S2	S4	S6	S8
T	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
S2		ns	ns	ns
S4			ns	ns
S6				ns

**Figure 87:** Courbes indiquant l'évolution du nombre de cellules OMP-positives pour une surface de 1000 µm<sup>2</sup> et du nombre de cellules PCNA-positives pour une longueur de 500 µm, avant (T), pendant (S2 et S4) et après (S6 et S8) l'exposition à la pyridine. Les tableaux correspondent aux résultats *post hoc* indiquant les différences significatives ou non significatives (ns) pour le nombre de cellules OMP-positives et le nombre de cellules PCNA-positives en fonction des semaines.

### Neurones olfactifs matures

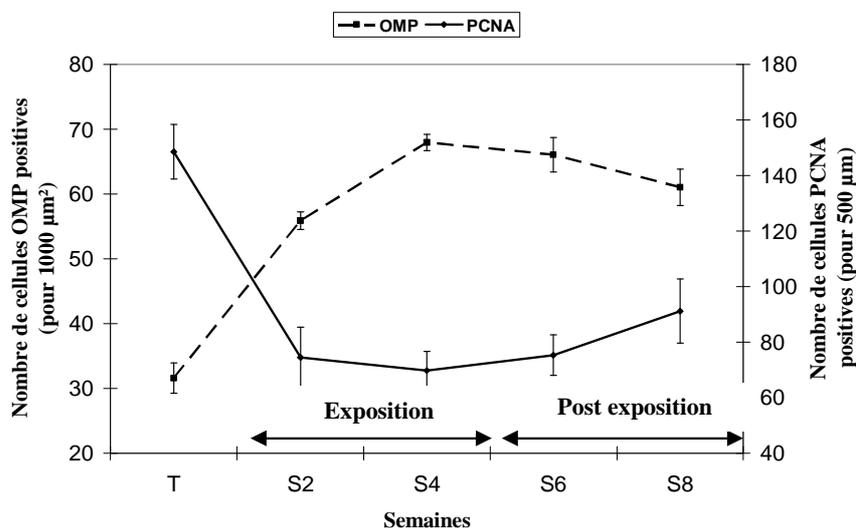
Le nombre de cellules OMP-positives augmente significativement jusqu'en fin d'exposition (S4). Il se stabilise ensuite pendant la période post exposition (S6/S8). En fin d'expérimentation (S8), le nombre de cellules OMP-positives est très supérieur aux valeurs mesurées avant l'exposition (T).

### Cellules en division

Dès la deuxième semaine d'exposition (S2), le nombre de cellules PCNA-positives chute significativement. Il se stabilise ensuite à ce niveau jusqu'en fin d'expérimentation (S8).

### 1-3- Exposition au CO<sub>2</sub> (5h)

Les résultats sont présentés figure 88 (Illustration III C, p136). L'ANOVA montre un effet semaine significatif pour le nombre de neurones olfactifs matures, marqués par l'OMP [F(4,36)=27,269 ; p<0,0001] et le nombre de cellules en division, marquées par le PCNA [F(4,36)=9,308 ; p<0,0001].



OMP	S2	S4	S6	S8
T	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
S2		0,0021	0,0007	ns
S4			ns	ns
S6				ns

PCNA	S2	S4	S6	S8
T	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,0002
S2		ns	ns	ns
S4			ns	ns
S6				ns

**Figure 88:** Courbes indiquant l'évolution du nombre de cellules OMP-positives pour une surface de 1000 µm<sup>2</sup> et du nombre de cellules PCNA-positives pour une longueur de 500 µm, avant (T), pendant (S2 et S4) et après (S6 et S8) l'exposition au CO<sub>2</sub>(5h). Les tableaux correspondent aux résultats *post hoc* indiquant les différences significatives ou non significatives (ns) pour le nombre de cellules OMP-positives et le nombre de cellules PCNA-positives en fonction des semaines.

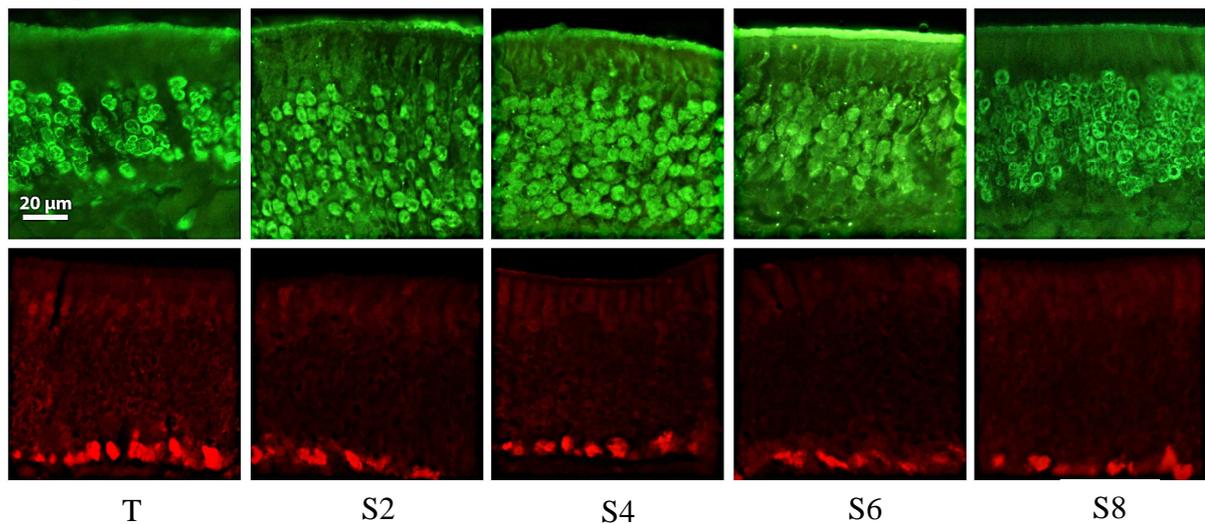
#### Neurones olfactifs matures

Dès la deuxième semaine d'exposition (S2), le nombre de cellules OMP-positives augmente significativement, cette augmentation se poursuit jusqu'en fin d'exposition (S4). Durant la phase post exposition (S6/S8), ce nombre se stabilise et reste significativement supérieur aux valeurs mesurées avant l'exposition (T).

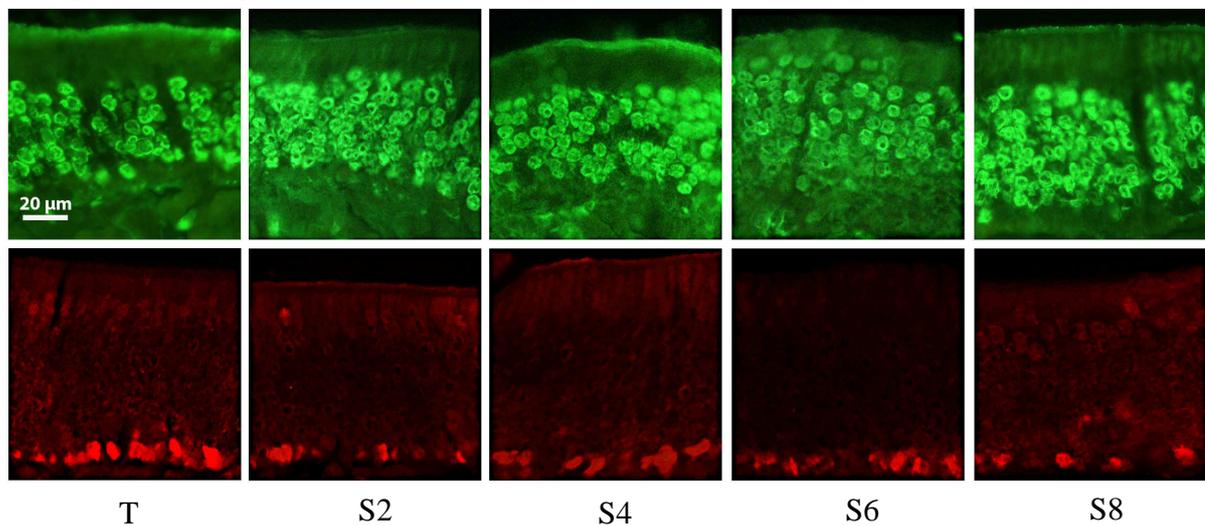
#### Cellules en division

Le nombre de cellules PCNA-positives diminue significativement à la deuxième semaine d'exposition (S2). Ce nombre reste ensuite constant et très inférieur aux valeurs du mesurées avant l'exposition (T).

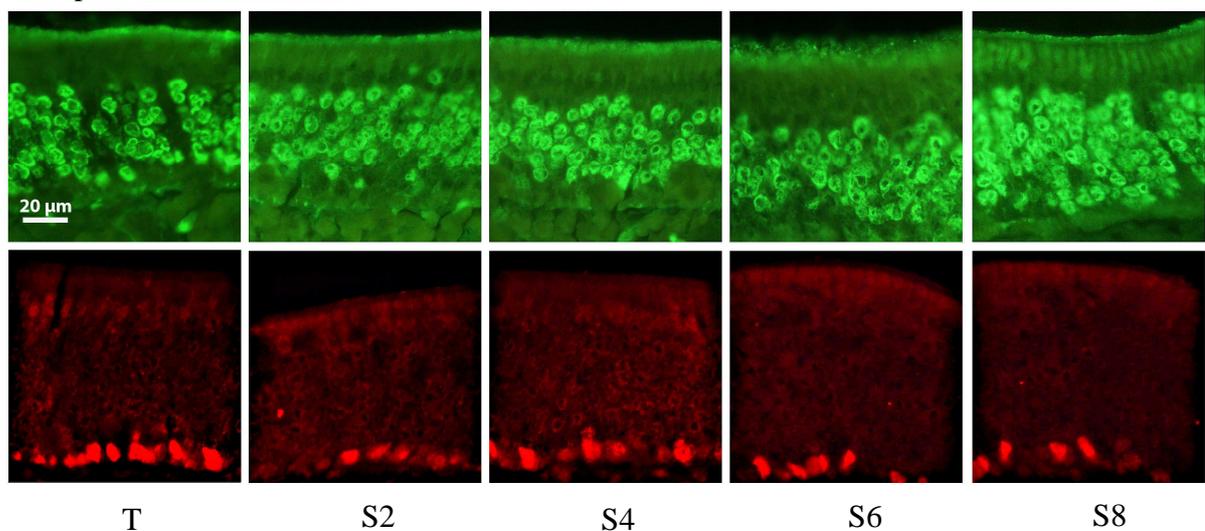
A. Exposition à l'acétone



B. Exposition à la pyridine



C. Exposition au CO<sub>2</sub> (5h)



**Illustration III** : Marquages immunohistochimiques des neurones olfactifs matures par l'OMP (en vert) et des cellules basales en prolifération par le PCNA (en rouge).

Grossissement x40.

A : Exposition à l'acétone

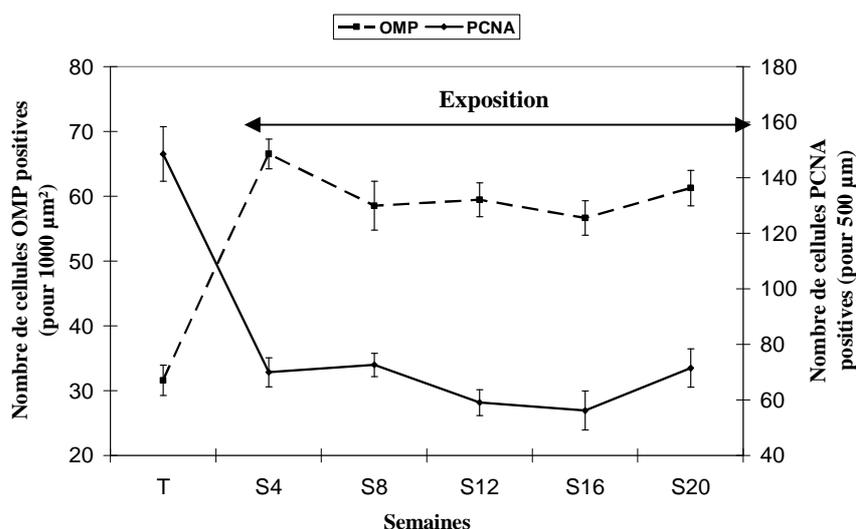
B : Exposition à la pyridine

C : Exposition au CO<sub>2</sub> (5h)

## II- Expositions de longue durée

### 2-1- Exposition à la pyridine

Les résultats sont présentés figure 89 (Illustration IV A, p140). L'ANOVA montre un effet semaine significatif pour le nombre de neurones olfactifs matures, marqués par l'OMP [F(5,45)=13,951 ; p<0,0001] et le nombre de cellules en division, marquées par le PCNA [F(5,45)=22,45 ; p<0,0001].



OMP	S4	S8	S12	S16	S20	PCNA	S4	S8	S12	S16	S20
T	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	T	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
S4		0,0483	ns	0,0372	ns	S4		ns	ns	ns	ns
S8			ns	ns	ns	S8			ns	ns	ns
S12				ns	ns	S12				ns	ns
S16					ns	S16					ns

**Figure 89:** Courbes indiquant l'évolution du nombre de cellules OMP-positives pour une surface de 1000 µm<sup>2</sup> et du nombre de cellules PCNA-positives pour une longueur de 500 µm, avant (T) et pendant (S4 à S20) l'exposition à la pyridine. Les tableaux correspondent aux résultats *post hoc* indiquant les différences significatives ou non significatives (ns) pour le nombre de cellules OMP-positives et le nombre de cellules PCNA-positives en fonction des semaines.

#### Neurones olfactifs matures

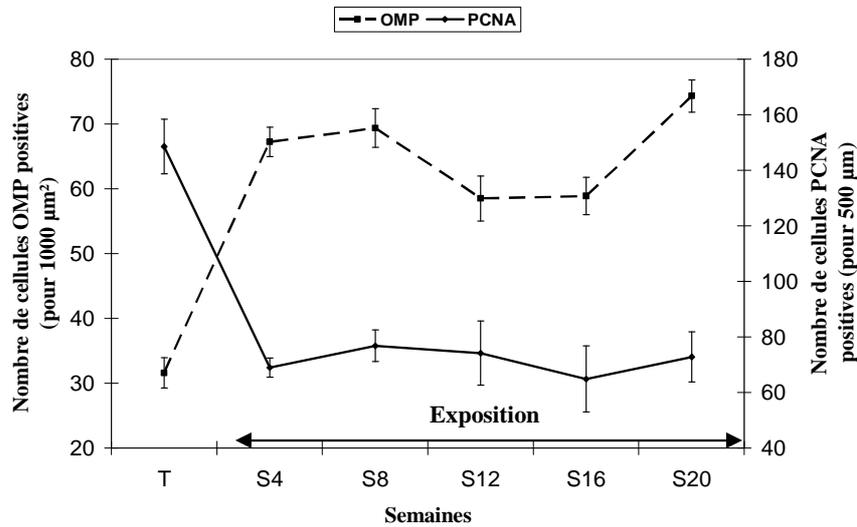
Le nombre de cellules OMP-positives augmente significativement dès la quatrième semaine d'exposition (S4), diminue légèrement à la huitième semaine d'exposition (S8) puis reste constant à ce niveau jusqu'en fin d'expérimentation.

#### Cellules en division

A la quatrième semaine d'exposition (S4), le nombre de cellules PCNA-positives diminue significativement, puis reste constant à ce niveau jusqu'à la fin de période d'exposition (S20).

## 2-2- Exposition au toluène

Les résultats sont présentés figure 90 (Illustration IV B, p140). L'ANOVA montre un effet semaine significatif pour le nombre de neurones olfactifs matures, marqués par l'OMP [F(5,45)=21,111 ; p<0,0001] et le nombre de cellules en division, marquées par le PCNA [F(5,45)=19,637 ; p<0,0001].



OMP	S4	S8	S12	S16	S20	PCNA	S4	S8	S12	S16	S20
T	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	T	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
S4		ns	0,028	0,0483	0,0477	S4		ns	ns	ns	ns
S8			0,0161	0,0269	ns	S8			ns	ns	ns
S12				ns	0,0007	S12				ns	ns
S16					0,0016	S16					ns

**Figure 90:** Courbes indiquant l'évolution du nombre de cellules OMP-positives pour une surface de 1000 µm<sup>2</sup> et du nombre de cellules PCNA-positives pour une longueur de 500 µm, avant (T) et pendant (S4 et S20) l'exposition au toluène. Les tableaux correspondent aux résultats *post hoc* indiquant les différences significatives ou non significatives (ns) pour le nombre de cellules OMP-positives et le nombre de cellules PCNA-positives en fonction des semaines.

### Neurones olfactifs matures

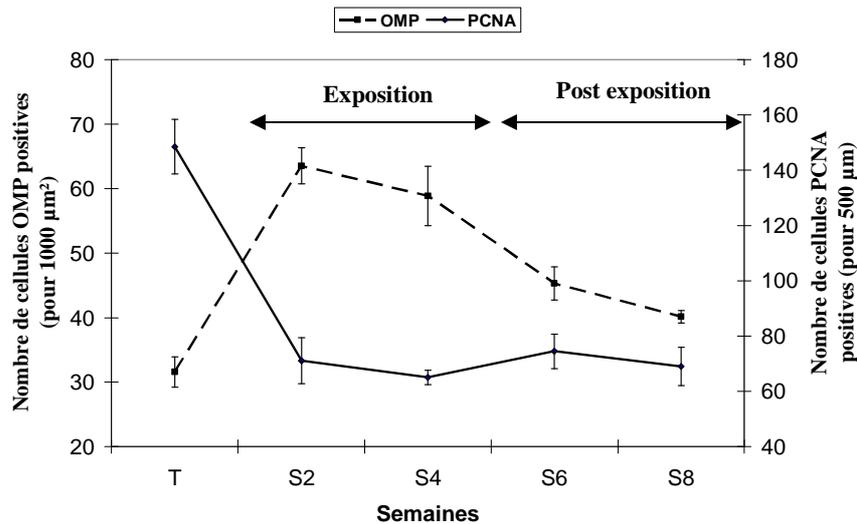
Le nombre de cellules OMP-positives augmente significativement à la quatrième semaine d'exposition (S4), ne varie pas jusqu'à la huitième semaine d'exposition (S8), puis diminue significativement aux douzièmes et seizièmes semaines d'exposition. En fin d'expérimentation (S20), ce nombre augmente significativement et devient très supérieur aux valeurs mesurées avant l'exposition (T).

### Cellules en division

Dès la quatrième semaine d'exposition (S4), le nombre de cellules PCNA-positives chute significativement, puis reste constant à ce niveau au cours de l'expérimentation avec des valeurs inférieures à celles mesurées avant l'exposition (T).

### 2-3- Exposition au CO<sub>2</sub> (12h)

Les résultats sont présentés figure 91 (Illustration IV C, p140). L'ANOVA montre un effet semaine significatif pour le nombre de neurones olfactifs matures, marqués par l'OMP [F(4,36)=18,724 ; p<0,0001] et le nombre de cellules en division, marquées par le PCNA [F(4,36)=17,841 ; p<0,0001].



OMP	S2	S4	S6	S8
T	<0,0001	<0,0001	0,0395	ns
S2		ns	0,0052	<0,0001
S4			0,0412	0,0013
S6				ns

PCNA	S2	S4	S6	S8
T	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
S2		ns	ns	ns
S4			ns	ns
S6				ns

**Figure 91:** Courbes indiquant l'évolution du nombre de cellules OMP-positives pour une surface de 1000 µm<sup>2</sup> et du nombre de cellules PCNA-positives pour une longueur de 500 µm, avant (T), pendant (S2 et S4) et après (S6 et S8) l'exposition CO<sub>2</sub> (12h). Les tableaux correspondent aux résultats *post hoc* indiquant les différences significatives ou non significatives (ns) pour le nombre de cellules OMP-positives et le nombre de cellules PCNA-positives en fonction des semaines.

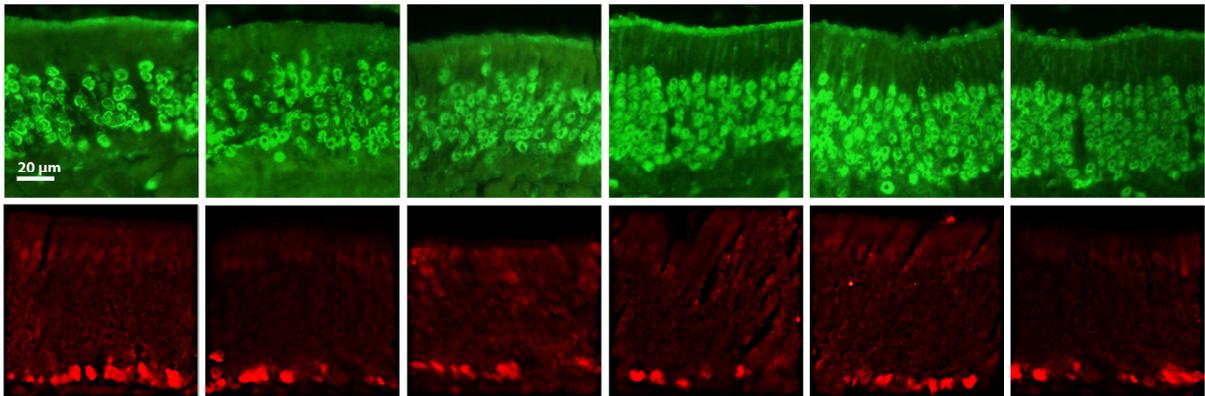
#### Neurones olfactifs matures

Le nombre de cellules OMP-positives augmente significativement en milieu d'exposition (S2), puis diminue pendant la période post exposition (S6/S8). En fin d'expérimentation (S8), ce nombre est proche des valeurs mesurées avant l'exposition (T).

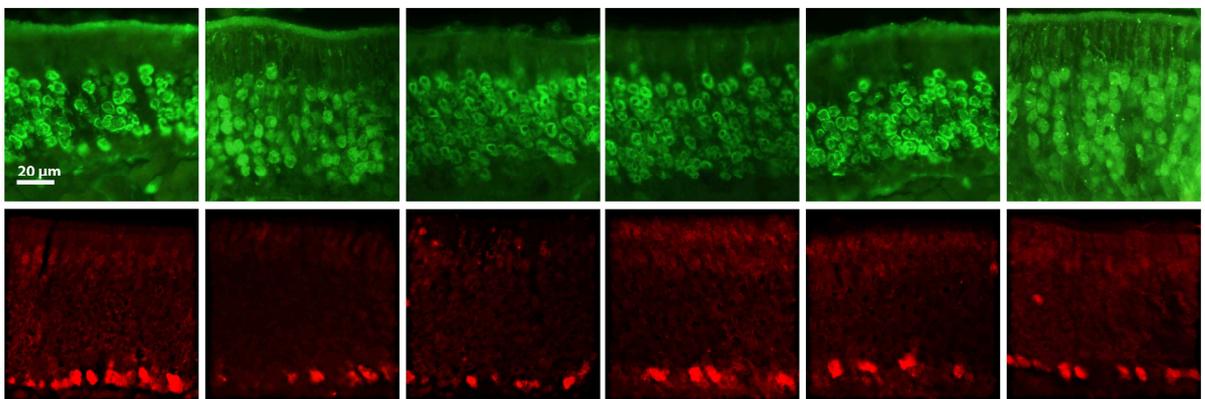
#### Cellules en division

Dès la deuxième semaine d'exposition (S2), le nombre de cellules PCNA-positives diminue significativement puis reste constant en fin de période d'exposition (S4) et durant la période post exposition (S8). En fin d'expérimentation (S8), ce nombre reste significativement inférieur aux valeurs mesurées avant l'exposition (T).

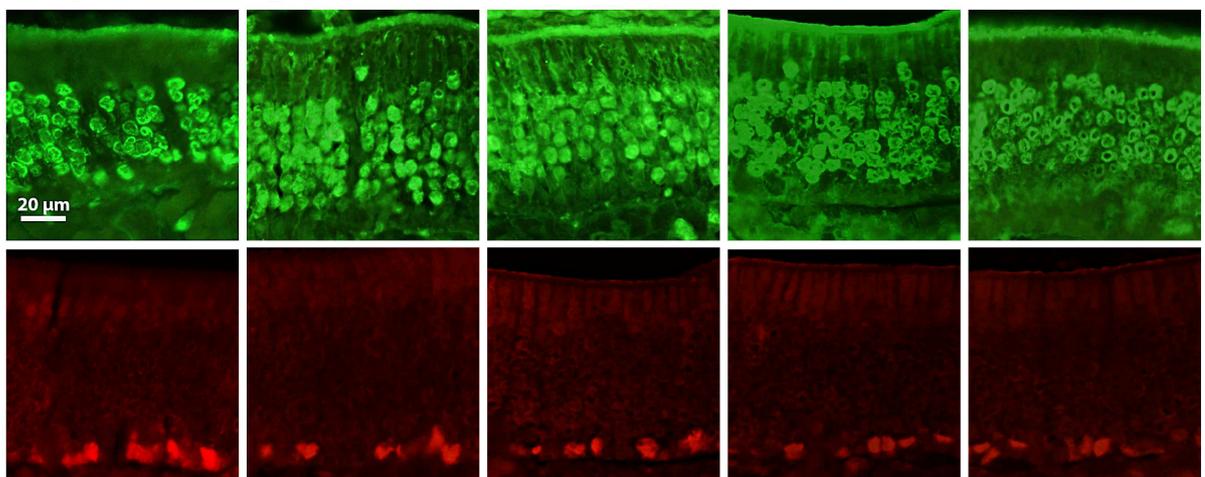
**A. Exposition à la pyridine (5 mois)**



**B. Exposition au toluène (5 mois)**



**C. Exposition au CO<sub>2</sub> (12h)**



**Illustration IV** : Marquages immunohistochimiques des neurones olfactifs matures par l'OMP (en vert) et des cellules basales en prolifération par le PCNA (en rouge).

Grossissement x40.

A : Exposition à la pyridine (5 mois)

B : Exposition au toluène (5 mois)

C : Exposition au CO<sub>2</sub> (12h)

### III- Récapitulatif

La figure 92 récapitule les résultats des mesures immunohistochimiques réalisées en fonction des différents produits d'exposition, et suivant la durée d'exposition. Les augmentations (↗), les diminutions (↘) ou les stabilisations (≈) du nombre de cellules OMP-positives et du nombre de cellules PCNA-positives dans l'épithélium olfactif sont indiquées par rapport aux valeurs mesurées avant l'exposition (T).

	Période d'exposition				Période de post exposition					
	S2		S4		S6		S8			
<i>Expositions de courte durée</i>	OMP	PCNA	OMP	PCNA	OMP	PCNA	OMP	PCNA		
<b>Acétone</b> (7500 ppm)	≈	↘	≈	↘	≈	↘	≈	≈		
<b>Pyridine</b> (3600 ppm)	↗	↘	↗	↘	↗	↘	↗	↘		
<b>CO<sub>2</sub> (5h)</b> (3%)	↗	↘	↗	↘	↗	↘	↗	↘		
<i>Expositions de longue durée</i>										
<b>CO<sub>2</sub> (12h)</b> (3%)	↗	↘	↗	↘	↗	↘	≈	↘		
Période d'exposition										
	S4		S8		S12		S16		S20	
<b>Pyridine</b> (50 ppm)	↗	↘	↗	↘	↗	↘	↗	↘	↗	↘
<b>Toluène</b> (260 ppm)	↗	↘	↗	↘	↗	↘	↗	↘	↗	↘

**Figure 92:** Récapitulatif des résultats immunohistochimiques (marquages à l'OMP et au PCNA de l'épithélium olfactif) obtenus lors des expositions de courte durée et des expositions de longue durée.

#### *Expositions de courte durée*

Les résultats montrent une atteinte des cellules basales en prolifération pour les trois molécules testées en courte durée soit l'acétone, la pyridine et le CO<sub>2</sub>(5h). En effet, dès la deuxième semaine d'exposition (S2), une diminution significative du nombre de cellules PCNA-positives est observée, cette baisse se poursuit lors de la période de post-exposition, indiquant un effet durable de l'exposition à l'acétone, à la pyridine et au CO<sub>2</sub>(5h) sur la prolifération cellulaire. En parallèle, alors que le nombre de neurones olfactifs matures ne varie pas au cours de l'expérimentation à l'acétone, une augmentation significative de ce nombre est mesuré lors de la période d'exposition à la pyridine et au CO<sub>2</sub>(5h). Dans les

deux cas, cette augmentation est suivie d'une stabilisation lors de la période de post exposition.

### ***Expositions de longue durée***

Les résultats montrent des modifications comparables du nombre de cellules basales en prolifération et du nombre de neurones olfactifs matures lors des expositions à la pyridine et au toluène. La dynamique d'évolution du nombre de cellules basales en prolifération est également similaire à celle des deux solvants lors de l'expérimentation au CO<sub>2</sub>(12h) sur les huit premières semaines. En revanche, le nombre de neurones olfactifs matures est comparable aux valeurs mesurées avant l'exposition en fin d'expérimentation lors de l'expérimentation au CO<sub>2</sub>(12h).

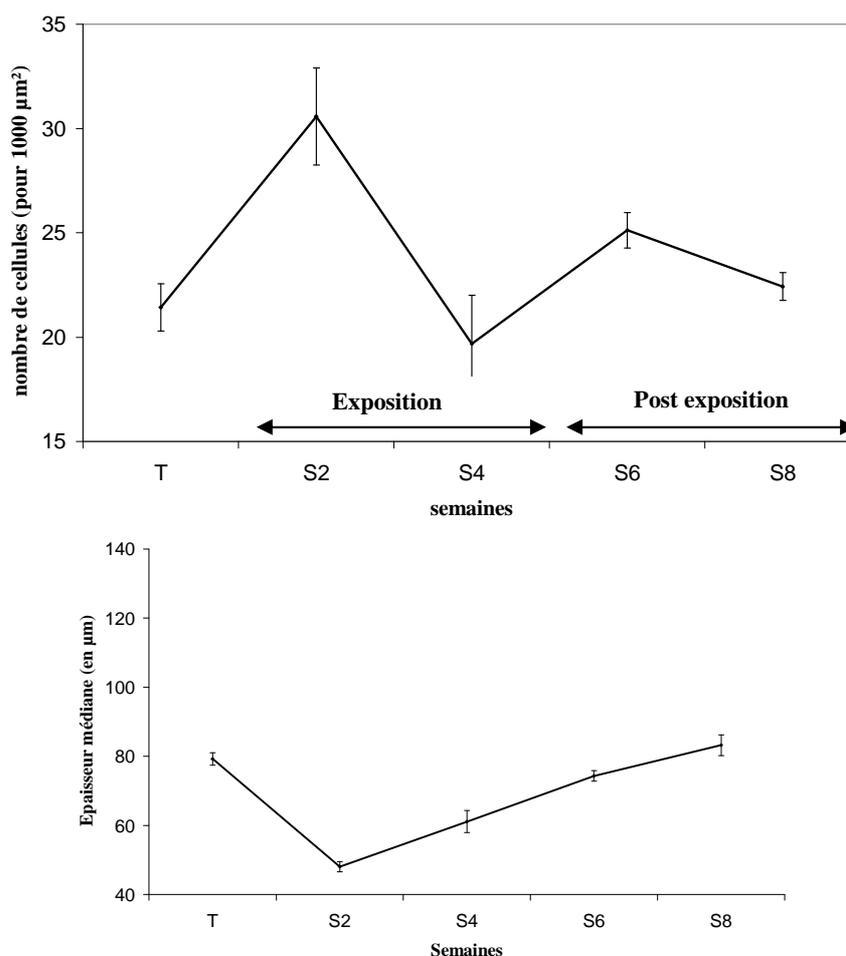
**Partie 5 : Effets de l'exposition à des polluants sur le système  
olfactif accessoire de la souris :  
mesures histologiques sur l'organe voméronasal**

## I- Expositions de courte durée

### 1-1- Exposition à l'acétone

#### a/ Epaisseur et nombre de cellules dans la zone médiane de l'épithélium de l'organe voméronasal (cellules matures)

L'ANOVA montre un effet semaine significatif pour le nombre total de cellules [ $F(4,72)=7,07$  ;  $p=0,0006$ ] et pour l'épaisseur médiane [ $F(4,72)=38,738$  ;  $p<0,0001$ ] (Figure 94).



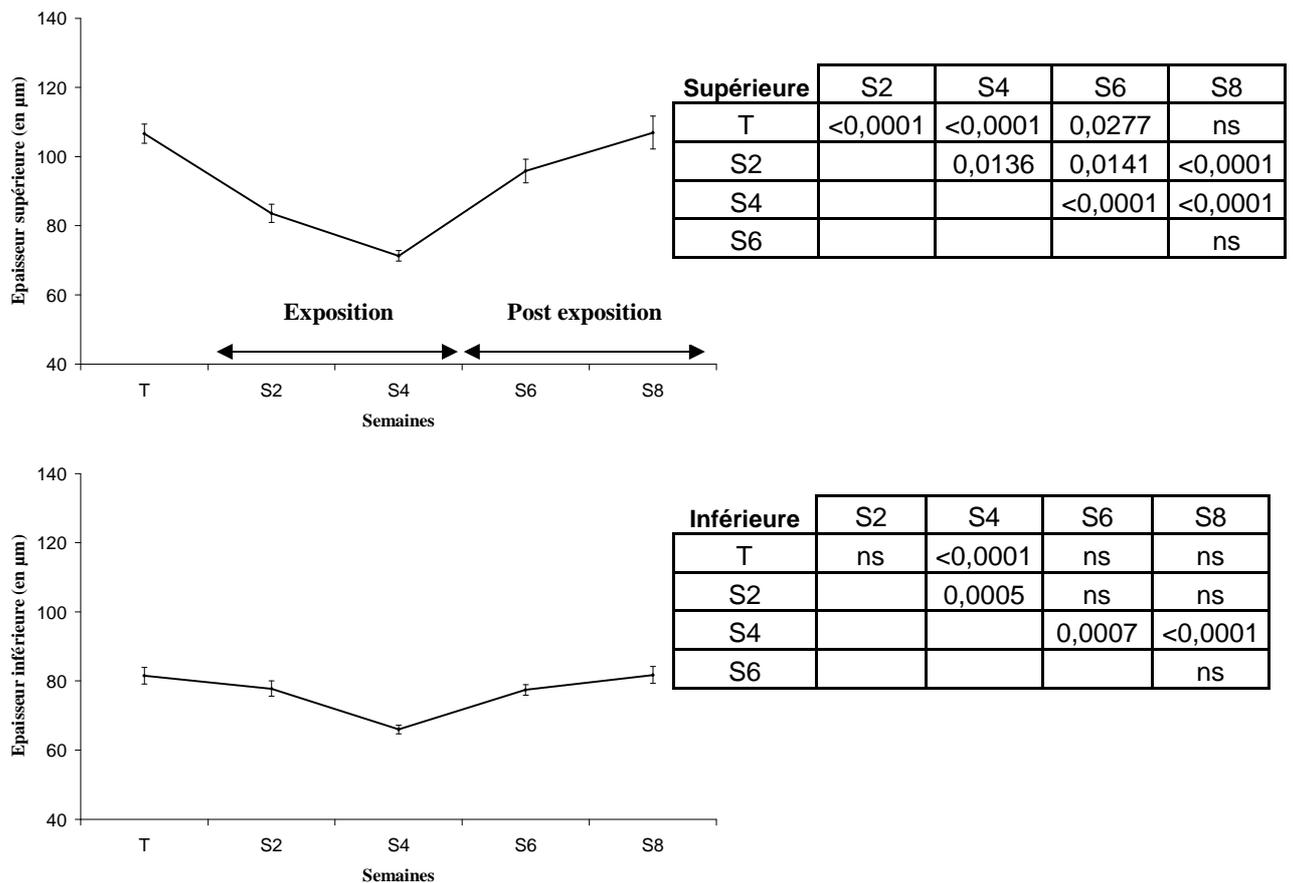
Cellules	S2	S4	S6	S8	Epaisseur	S2	S4	S6	S8
	T	0,0003	ns	0,0492		ns	T	<0,0001	<0,0001
S2		<0,0001	0,02	0,0005	S2		0,0008	<0,0001	<0,0001
S4			0,0077	ns	S4			0,0007	<0,0001
S6				ns	S6				0,0133

**Figure 94:** Courbe indiquant l'évolution du nombre total de cellules (pour une surface de 1000 µm<sup>2</sup>) et de l'épaisseur dans la partie médiane de l'épithélium de l'organe voméronasal en fonction des semaines avant (T), pendant (S2 et S4) et après (S6 et S8) l'exposition à l'acétone. Les tableaux présentent les résultats *post-hoc* montrant les différences significatives ou non significatives (ns) entre les mesures. Au milieu de l'exposition à l'acétone (S2), le nombre de cellule augmente fortement, puis diminue en fin d'exposition (S4). Après l'arrêt de l'exposition (S6), une augmentation significative du nombre total de cellules apparaît. En fin de période de post-exposition

(S8), le nombre de cellule est similaire à celui mesuré avant l'exposition (T). L'épaisseur médiane de l'épithélium voméronasal diminue en milieu d'exposition (S2) puis augmente progressivement en fin d'exposition (S4) et lors de la période de post-exposition (S6/S8) pour retrouver des valeurs comparables à celles mesurées avant l'exposition (T) en fin de période de post-exposition

**b/ Epaisseur de l'épithélium de l'organe voméronasal dans les zones de prolifération cellulaire (zones supérieure et inférieure)**

L'ANOVA montre un effet semaine significatif pour les deux épaisseurs [supérieure :  $F(4,72)=22,919$  ;  $p<0,0001$ ] et inférieure [ $F(4,72)=10,272$  ;  $p=0,0001$ ] (Figure 93, illustration VA, p152). Au cours de l'exposition à l'acétone, une diminution significative des épithéliums inférieur et supérieur apparaît en fin d'exposition (S4). Dès l'arrêt de l'exposition à l'acétone, les épaisseurs augmentent pour retrouver leur niveau initial en fin de période de post-exposition (S8).

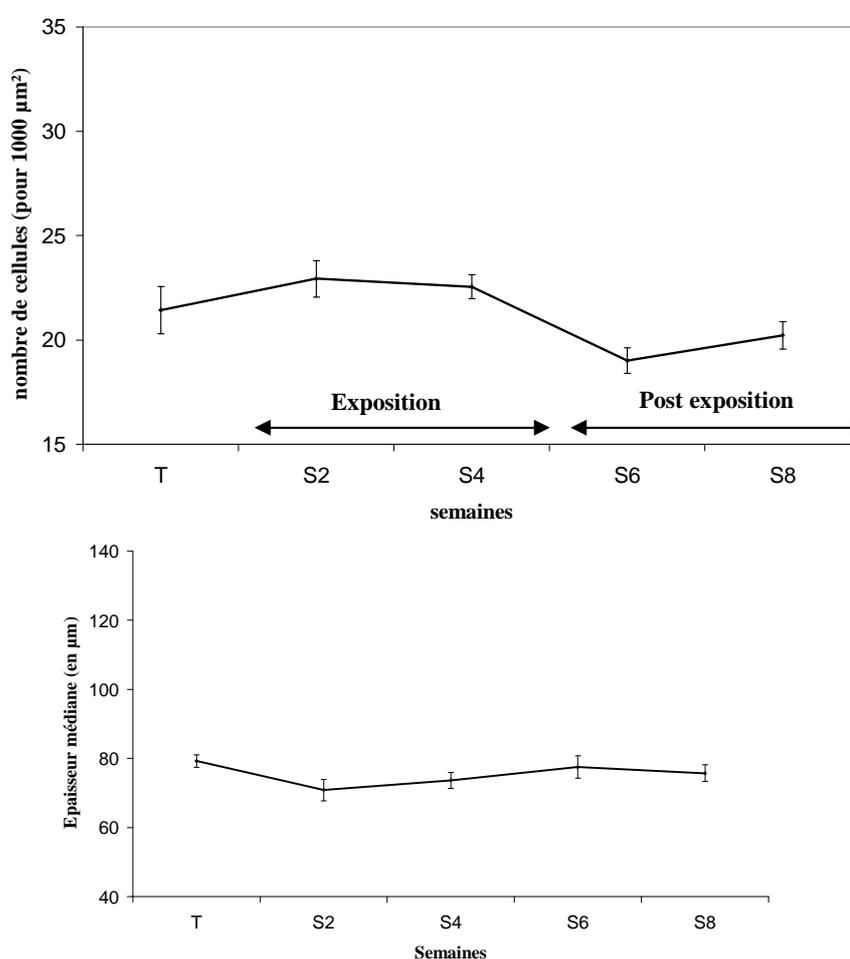


**Figure 93:** Courbes indiquant l'évolution des épaisseurs (en µm) supérieure et inférieure de l'épithélium de l'organe voméronasal en fonction des semaines avant (T), pendant (S2 et S4) et après (S6 et S8) l'exposition à l'acétone. Les tableaux situés à droite des courbes correspondent aux résultats *post hoc* indiquant les différences significatives ou non significatives (ns) entre les mesures.

## 1-2- Exposition à la pyridine

### a/ Epaisseur et nombre de cellules dans la zone médiane de l'épithélium de l'organe voméronasal (cellules matures)

L'ANOVA montre un effet semaine significatif pour le nombre total de cellules [ $F(4,72)=4,912$  ;  $p=0,0033$ ] et l'épaisseur [ $F(4,72)=3,528$  ;  $p=0,0138$ ] (Figure 96). Le nombre de cellules reste stable pendant la période d'exposition (S2/S4) puis diminue significativement après l'arrêt de l'exposition à la pyridine (S6/S8). L'épaisseur de l'épithélium voméronasal diminue également de façon significative lors de la période d'exposition (S2/S4) puis retrouve des valeurs comparables à celles mesurées avant l'exposition (T) lors de la période de post-exposition (S6/S8).



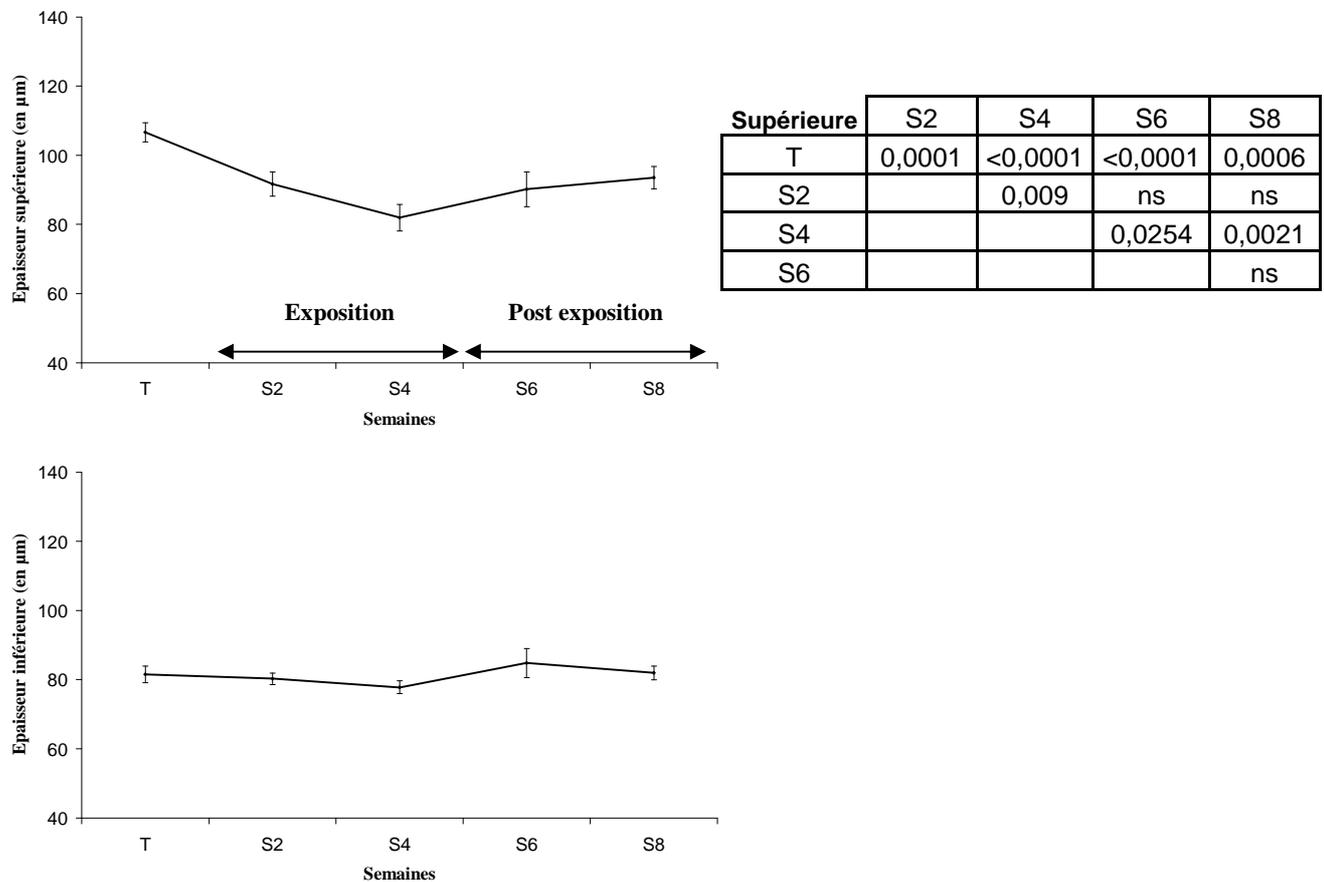
Cellules	S2	S4	S6	S8
T	ns	ns	0,0312	ns
S2		ns	0,0009	0,0167
S4			0,0016	0,0303
S6				ns

Epaisseur	S2	S4	S6	S8
T	0,014	0,0296	ns	ns
S2		ns	0,0096	ns
S4			ns	ns
S6				ns

**Figure 96:** Courbe indiquant l'évolution du nombre de cellules (pour une surface de 1000  $\mu\text{m}^2$ ) et de l'épithélium dans la partie médiane de l'épithélium de l'organe voméronasal en fonction des semaines avant (T), pendant (S2 et S4) et après (S6 et S8) l'exposition à la pyridine. Le tableau présente les résultats *post hoc* montrant les différences significatives ou non significatives (ns) entre les mesures.

**b/ Epaisseur de l'épithélium de l'organe voméronasal dans les zones de prolifération cellulaire (zones supérieure et inférieure)**

L'ANOVA ne montre pas d'effet semaine significatif pour l'épaisseur inférieure de l'organe voméronasal [ $F(4,72)=2,199$  ;  $p=0,0843$ ] (Figure 95, illustration VB, p152). En revanche, L'ANOVA montre un effet semaine significatif pour l'épaisseur supérieure [ $F(4,72)=12,66$  ;  $p<0,0001$ ]. Lors de l'exposition à la pyridine, une diminution de l'épaisseur supérieure est mesurée en fin de période d'exposition. Durant la période de post exposition (S6/S8), l'épaisseur supérieure reste plus faible que les valeurs mesurées avant l'exposition (T).

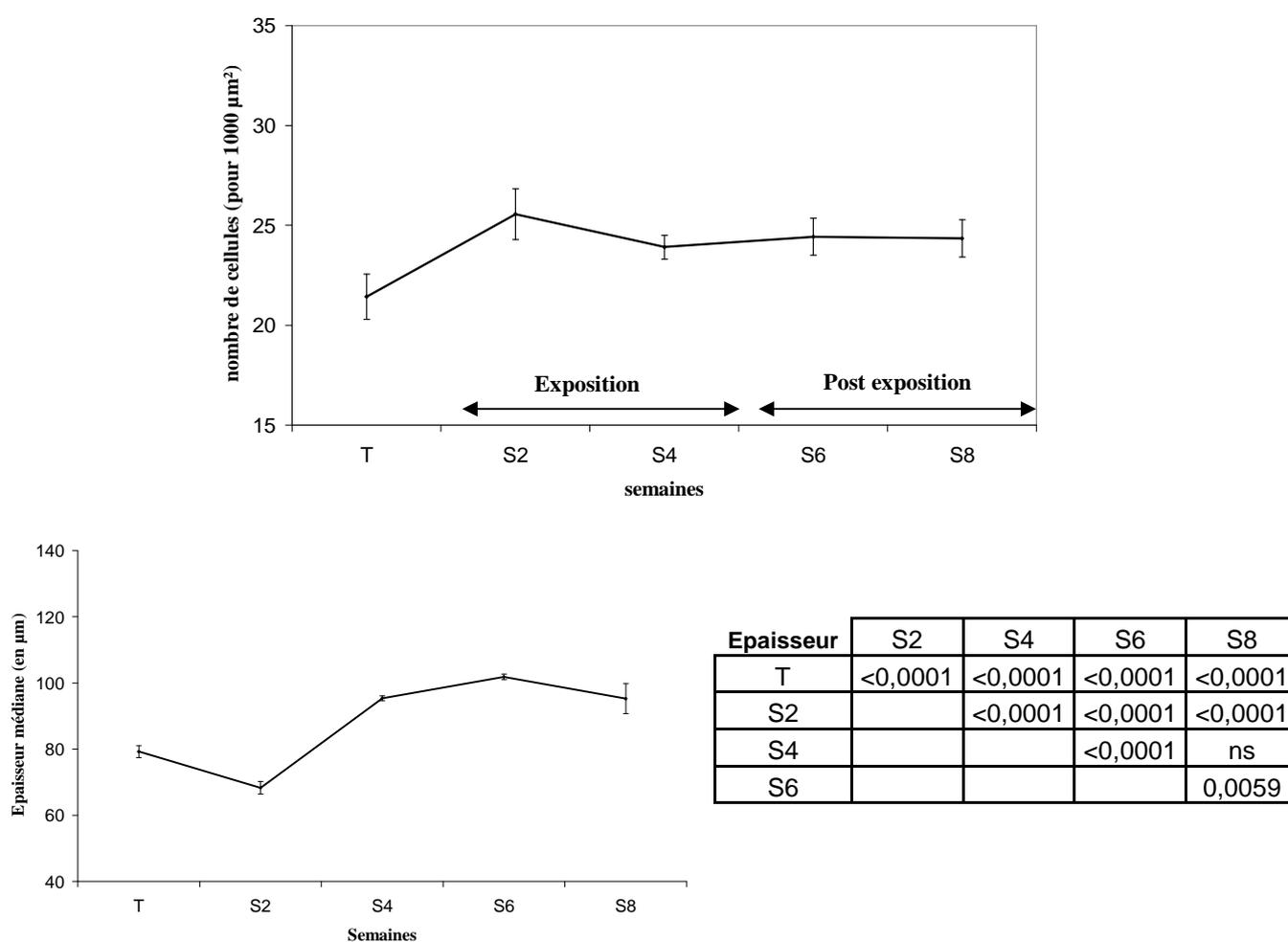


**Figure 95:** Courbes indiquant l'évolution des épaisseurs (en  $\mu\text{m}$ ) supérieure et inférieure de l'épithélium de l'organe voméronasal en fonction des semaines avant (T), pendant (S2 et S4) et après (S6 et S8) l'exposition à la pyridine. Les tableaux situés à droite des courbes correspondent aux résultats *post-hoc* indiquant les différences significatives ou non significatives (ns) entre les mesures.

### 1-3- Exposition au toluène

#### a/ Epaisseur et nombre de cellules dans la zone médiane de l'épithélium de l'organe voméronasal (cellules matures)

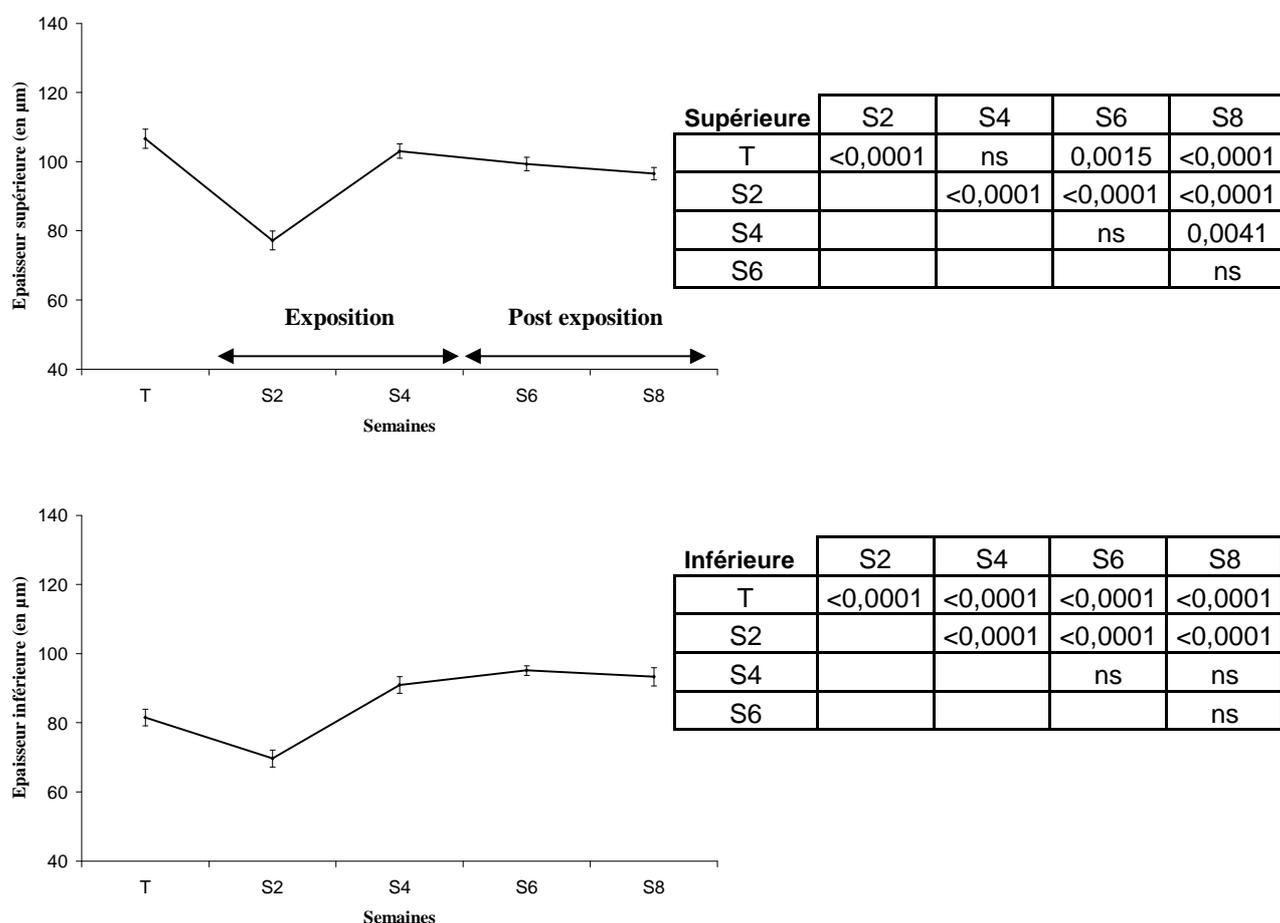
L'ANOVA ne montre pas d'effet semaine significatif pour le nombre total de cellules [F(4,72)=2,087 ; p=0,1049], mais un effet semaine significative pour l'épaisseur [F(4,72)=74,499, p<0,0001] (Figure 98). L'épaisseur de l'épithélium de l'organe voméronasal diminue significativement en milieu d'exposition (S2) puis augmente en fin d'exposition (S4) et jusqu'en milieu de période de post exposition (S6). En fin de période de post-exposition (S8), l'épaisseur médiane est supérieure à celle mesurée avant l'exposition (T).



**Figure 98:** Courbe indiquant l'évolution du nombre de cellules (pour une surface de 1000 μm<sup>2</sup>) et de l'épaisseur (en μm) dans la partie médiane de l'épithélium de l'organe voméronasal en fonction des semaines avant (T), pendant (S2 et S4) et après (S6 et S8) l'exposition au toluène.

### b/ Epaisseur de l'épithélium de l'organe voméronasal dans les zones de prolifération cellulaire (zones supérieure et inférieure)

L'ANOVA montre un effet semaine significatif pour les deux épaisseurs [supérieure :  $F(4,72)=56,628$ ,  $p<0,0001$  ; inférieure :  $F(4,72)=48,286$ ,  $p<0,0001$ ] (Figure 97, illustration VC, p152). En milieu d'exposition au toluène (S2), une diminution significative de l'épaisseur de l'épithélium de l'organe voméronasal est observée pour les deux zones. Dès la fin de l'exposition (S4), l'épaisseur supérieure retrouve des valeurs comparables à celles mesurées avant l'exposition (T). Au cours de la période de post-exposition (S6/S8), elle diminue progressivement, avec des valeurs inférieures à celles mesurées avant l'exposition (T). L'épaisseur inférieure augmente significativement en fin d'exposition (S4) puis se stabilise au cours de la période de post-exposition (S6/S8). En fin de période de post-exposition (S8), elle est supérieure à celle mesurée avant l'exposition (T).

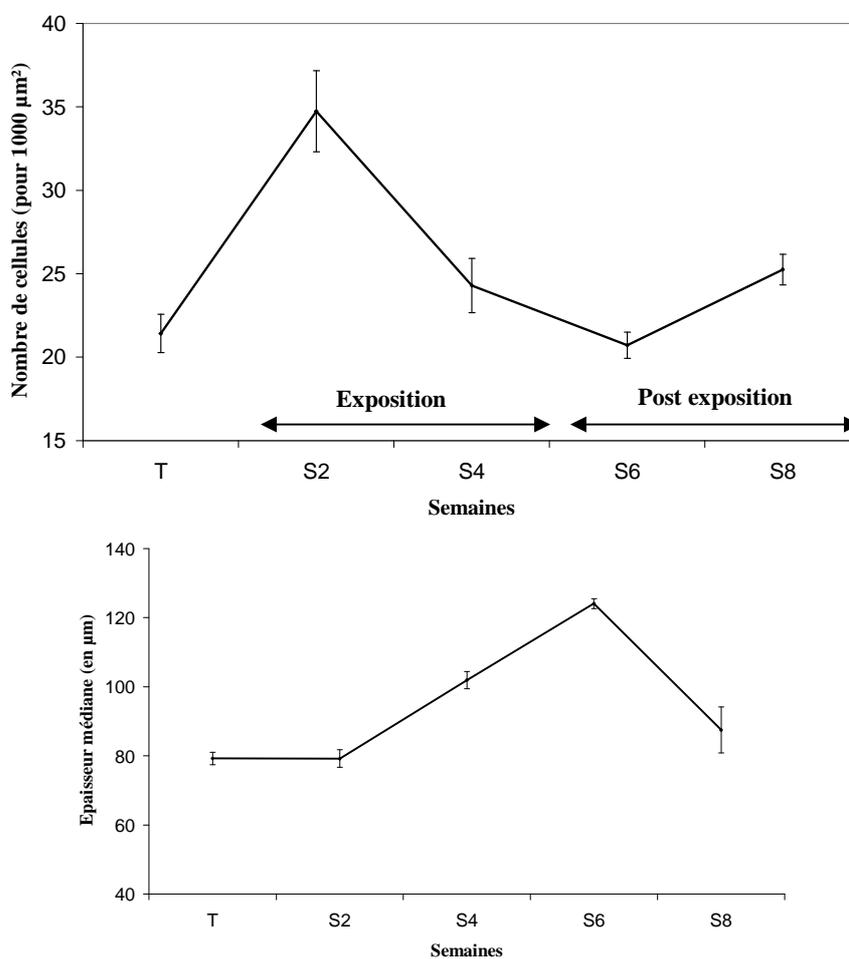


**Figure 97:** Courbes indiquant l'évolution des épaisseurs (en  $\mu\text{m}$ ) supérieure et inférieure de l'épithélium de l'organe voméronasal en fonction des semaines avant (T), pendant (S2 et S4) et après (S6 et S8) l'exposition au toluène. Les tableaux situés à droite des courbes correspondent aux résultats *post hoc* indiquant les différences significatives ou non significatives (ns) entre les mesures.

## 1-4- Exposition au CO<sub>2</sub> (5h)

### a/ Epaisseur et nombre de cellules dans la zone médiane de l'épithélium de l'organe voméronasal (cellules matures)

L'ANOVA montre un effet semaine significatif pour le nombre total de cellules [F(4,72)=12,57 ; p<0,0001] et l'épaisseur [F(4,72)=31,501 ; p<0,0001] (Figure 100). Dès le milieu de l'exposition au CO<sub>2</sub> (S2), le nombre de cellules augmente significativement. Il diminue ensuite en fin de période d'exposition (S4) puis reste constant à ce niveau durant la période de post exposition (S6/S8). L'épaisseur de l'épithélium voméronasal augmente significativement fin d'exposition (S4) et en milieu de période de post exposition (S6), puis diminue en fin de période de post-exposition (S8) pour revenir à des valeurs comparables à celles mesurées avant l'exposition (T).



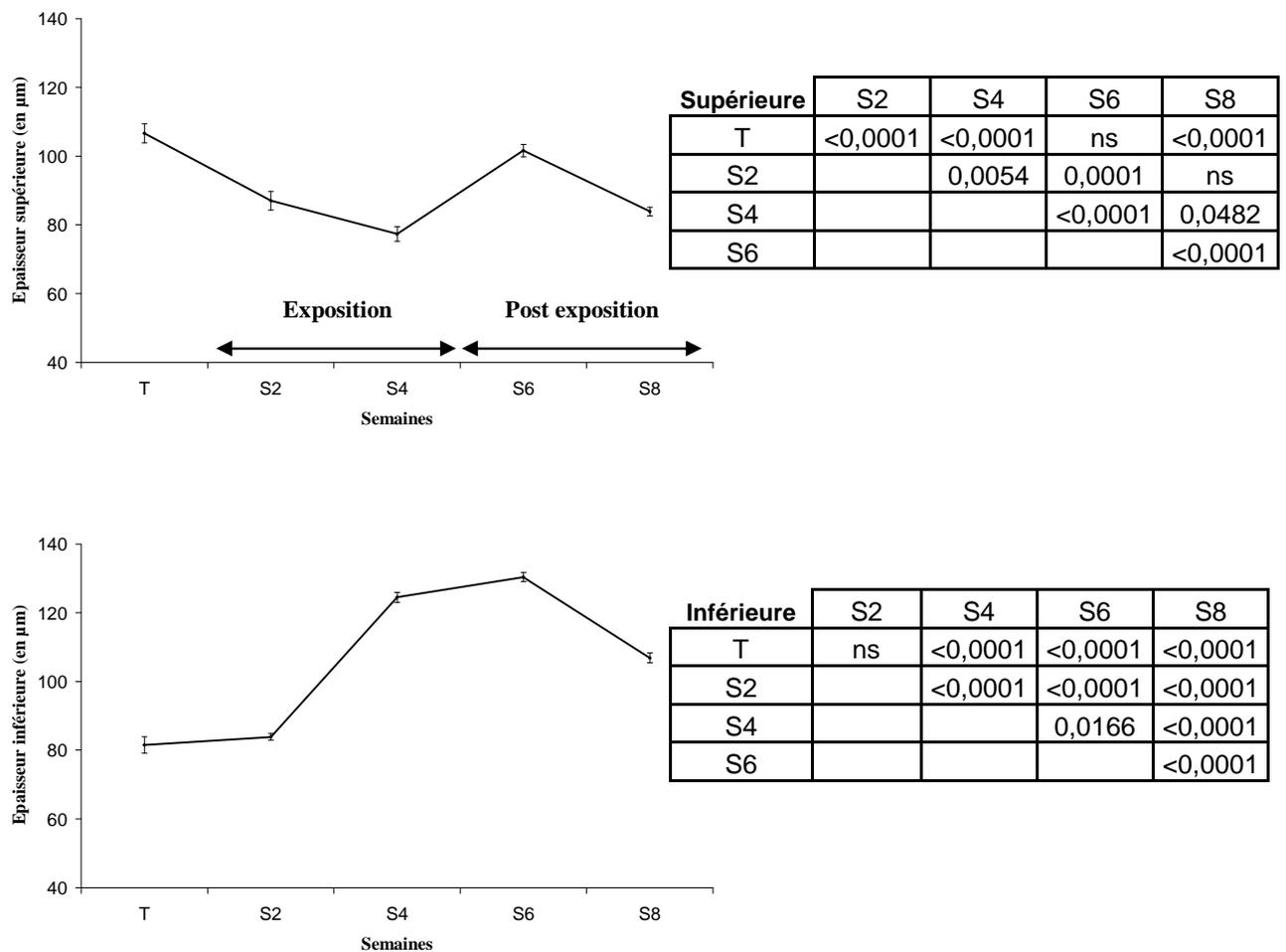
Cellules	S2	S4	S6	S8
T	<0,0001	ns	ns	ns
S2		0,0002	<0,0001	0,0001
S4			ns	ns
S6				ns

Epaisseur	S2	S4	S6	S8
T	ns	0,0001	<0,0001	ns
S2		0,0001	<0,0001	ns
S4			0,0002	0,007
S6				<0,0001

**Figure 100:** Courbe indiquant l'évolution du nombre de cellules (pour une surface de 1000 µm<sup>2</sup>) et l'épaisseur (en µm) dans la partie médiane de l'épithélium de l'organe voméronasal en fonction des semaines avant (T), pendant (S2 et S4) et après (S6 et S8) l'exposition au CO<sub>2</sub> (5h). Le tableau présente les résultats *post hoc* montrant les différences significatives ou non significatives (ns) entre les mesures.

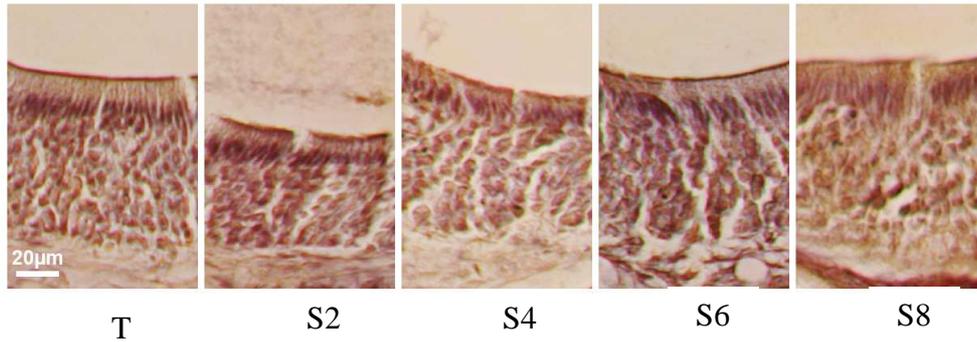
**b/ Epaisseur de l'épithélium de l'organe voméronasal dans les zones de prolifération cellulaire (zones supérieure et inférieure)**

L'ANOVA montre un effet semaine significatif pour les deux épaisseurs [supérieure :  $F(4,72)=31,592$ ,  $p<0,0001$  ; inférieure :  $F(4,72)=198,764$  ;  $p<0,0001$ ] (Figure 99, illustration VD, p152). L'épaisseur supérieure diminue pendant la période d'exposition (S2/S4), tandis que l'épaisseur inférieure augmente (S4) et reste élevée pendant la période de post exposition (S6/S8). En fin de période de post-exposition (S8), l'épaisseur supérieure est plus faible que celle mesurée avant le début de l'expérimentation (T).

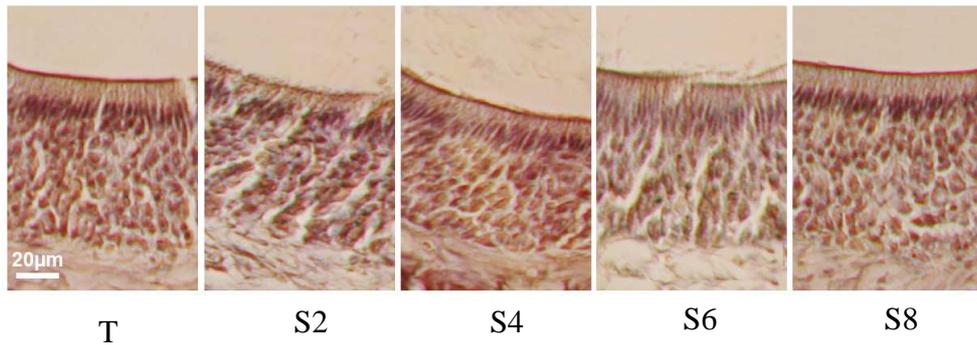


**Figure 99:** Courbes indiquant l'évolution des épaisseurs (en  $\mu\text{m}$ ) supérieure et inférieure de l'épithélium de l'organe voméronasal en fonction des semaines avant (T), pendant (S2 et S4) et après (S6 et S8) l'exposition au  $\text{CO}_2$  (5h). Les tableaux situés à droite des courbes correspondent aux résultats *post hoc* indiquant les différences significatives ou non significatives (ns) entre les mesures.

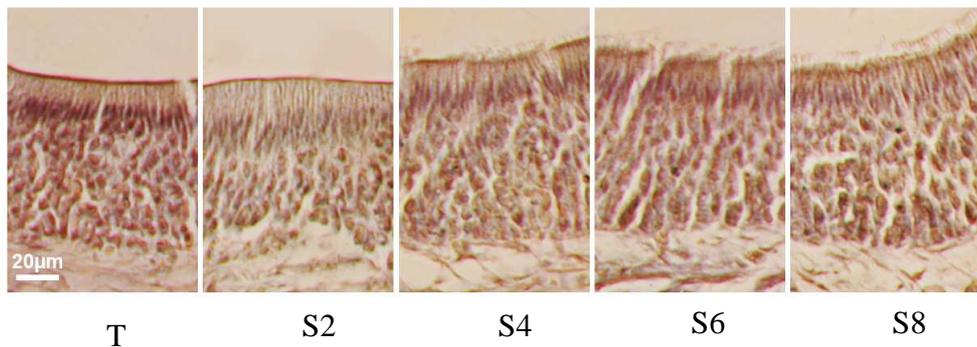
A. Exposition à l'acétone



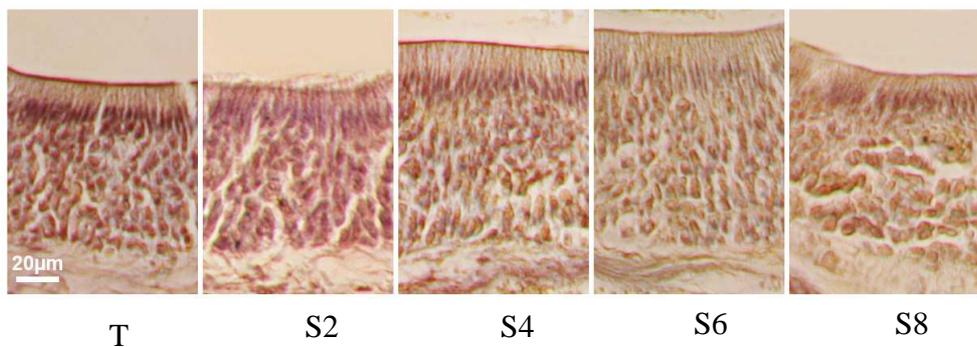
B. Exposition à la pyridine



C. Exposition au toluène



D. Exposition au CO<sub>2</sub> (5h)



**Illustration V** : Aspect histologique de l'épithélium de l'organe voméronasal des souris avant (T), pendant (S2/S4) et après (S6/S8) l'exposition à un polluant.

Coloration nucléaire à l'hématoxyline de Harris. Grossissement x20.

A : Exposition à l'acétone

B : Exposition à la pyridine

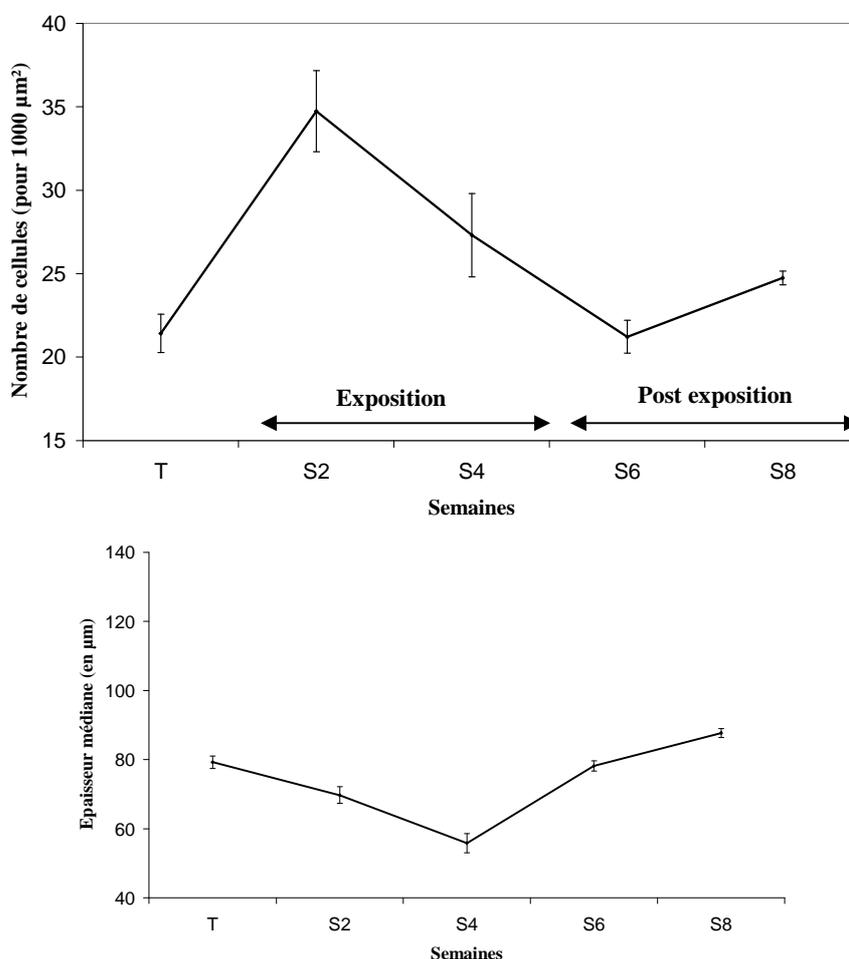
C : Exposition au toluène

D : Exposition au CO<sub>2</sub> (5h)

## II- Exposition de longue durée : exemple du CO<sub>2</sub> (12h)

### a/ Epaisseur et nombre de cellules dans la zone médiane de l'épithélium de l'organe voméronasal (cellules matures)

L'ANOVA montre un effet semaine significatif pour le nombre total de cellules [F(4,72)=8,727 ; p=0,0002] et pour l'épaisseur [F(4,72)=35,405 ; p<0,0001] (Figure 102). L'évolution du nombre de cellules dans l'épithélium de l'organe voméronasal suit la même dynamique que pour l'exposition au CO<sub>2</sub> (5h). En effet, le nombre de cellule augmente rapidement en milieu d'exposition (S2), puis diminue en fin d'exposition (S4). Il retrouve son niveau initial au cours de la période post exposition (S6 et S8). L'épaisseur de l'épithélium voméronasal diminue lors de l'exposition (S2/S4) puis augmente significativement lors de la période de post-exposition (S6/S8).



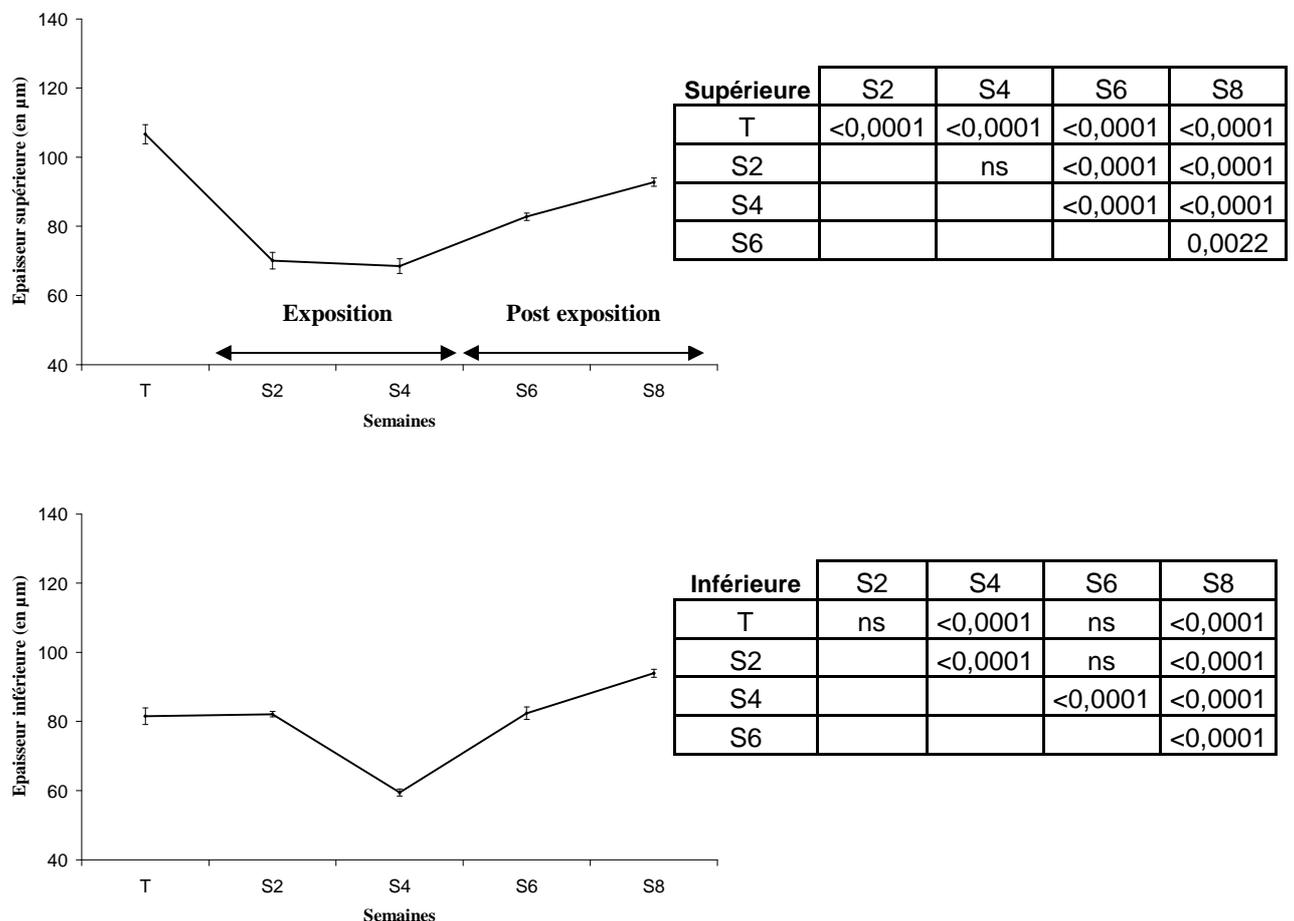
Cellules	S2	S4	S6	S8
T	0,0002	ns	ns	ns
S2		0,008	<0,0001	0,0011
S4			0,0254	ns
S6				ns

Epaisseur	S2	S4	S6	S8
T	0,0034	<0,0001	ns	0,008
S2		<0,0001	0,0083	<0,0001
S4			<0,0001	<0,0001
S6				0,0033

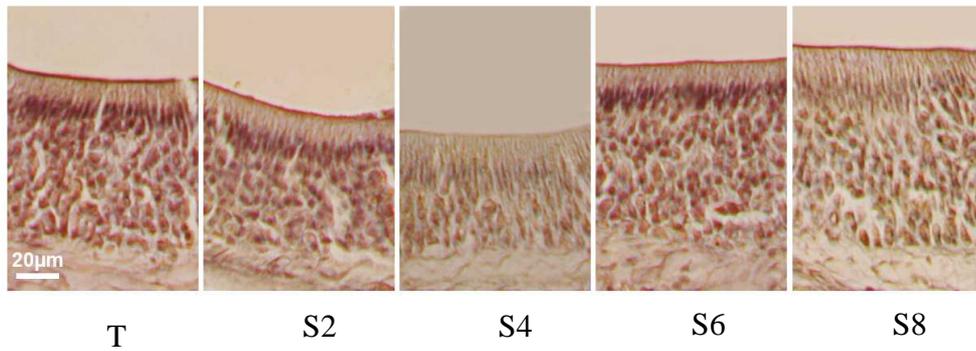
**Figure 102:** Courbe indiquant l'évolution du nombre de cellules (pour une surface de 1000 µm<sup>2</sup>) dans la partie médiane de l'épithélium de l'organe voméronasal en fonction des semaines avant (T), pendant (S2 et S4) et après (S6 et S8) l'exposition au CO<sub>2</sub> (12h). Le tableau présente les résultats *post hoc* montrant les différences significatives ou non significatives (ns) entre les mesures.

**b/ Epaisseur de l'épithélium de l'organe voméronasal dans les zones de prolifération cellulaire (zones supérieure et inférieure)**

L'ANOVA montre un effet semaine significatif pour les deux épaisseurs [supérieure :  $F(4,72)=62,605$  ;  $p<0,0001$  ; inférieure :  $F(4,72)=66,124$  ;  $p<0,0001$ ] (Figure 101, illustration VI, p155). L'épaisseur supérieure diminue significativement en milieu d'exposition (S2) tandis que l'épaisseur inférieure reste stable. En fin d'exposition (S4), l'épaisseur inférieure diminue alors que l'épaisseur supérieure se stabilise. Lors de la période post exposition (S6, S8), les deux épaisseurs suivent la même évolution et augmentent significativement. En fin de période de post-exposition (S8), l'épaisseur inférieure est significativement plus élevée que les valeurs mesurées avant l'exposition (T) alors que l'épaisseur supérieure reste significativement plus faible.



**Figure 101:** Courbes indiquant l'évolution des épaisseurs (en  $\mu\text{m}$ ) supérieure et inférieure de l'épithélium de l'organe voméronasal en fonction des semaines avant (T), pendant (S2 et S4) et après (S6 et S8) l'exposition au  $\text{CO}_2$  (12h). Les tableaux situés à droite des courbes correspondent aux résultats *post hoc* indiquant les différences significatives ou non significatives (ns) entre les mesures.



**Illustration VI** : Aspect histologique de l'épithélium de l'organe voméronasal des souris avant (T), pendant (S2/S4) et après (S6/S8) l'exposition au CO<sub>2</sub> (12h). Coloration nucléaire à l'hématoxyline de Harris. Grossissement x20.

### III- Récapitulatif

La figure 103 récapitule les résultats obtenus lors des différentes expérimentations de courte et de longue durée. Les augmentations (↗), les diminutions (↘) ou les stabilisations (≈) de l'épaisseur et du nombre de cellules dans la zone médiane de l'épithélium de l'organe voméronasal sont indiquées par rapport aux valeurs mesurées avant l'exposition (T).

<b><u>Zone médiane</u></b>	<b>Période d'exposition</b>				<b>Période post exposition</b>			
	<b>S2</b>		<b>S4</b>		<b>S6</b>		<b>S8</b>	
<i>Expositions de courte durée</i>	Epaisseur	Nombre de cellules	Epaisseur	Nombre de cellules	Epaisseur	Nombre de cellules	Epaisseur	Nombre de cellules
<b>Acétone</b> (7500 ppm)	↘	↗	↘	≈	≈	↗	≈	≈
<b>Pyridine</b> (3600 ppm)	↘	≈	↘	≈	≈	↘	≈	≈
<b>Toluène</b> (1000) ppm)	↘	≈	↗	≈	↗	≈	↗	≈
<b>CO<sub>2</sub> (5h)</b> (3%)	≈	↗	↗	≈	↗	≈	≈	≈
<i>Exposition de longue durée</i>								
<b>CO<sub>2</sub> (12h)</b> (3%)	↘	↗	↘	≈	≈	≈	↗	≈

**Figure 103:** Récapitulatif des mesures histologiques réalisées dans la partie médiane (épaisseur et nombre de cellules) de l'épithélium de l'organe voméronasal des souris lors des expositions de courte et de longue durées.

Les résultats mettent en évidence des modifications de densité cellulaire et de l'épaisseur de l'épithélium voméronasal en fonction des durées et des molécules d'exposition. Cependant, ces atteintes sont transitoires car en fin de période de post-exposition, les valeurs histologiques retrouvent les valeurs proches de celles obtenues avant l'exposition (T), indiquant une récupération totale de l'intégrité de l'épithélium de l'organe voméronasal. Il faut également noter que la durée d'exposition semble jouer un rôle sur l'évolution de l'épaisseur et non sur la densité cellulaire. En effet, l'étude menée sur le CO<sub>2</sub> avec deux durées d'exposition montre que si les épaisseurs varient différemment, l'évolution du nombre de cellules suit la même cinétique dans le cas de l'exposition à 5h et à 12h. De plus, les modifications d'épaisseur dans les zones supérieure et inférieure sont corrélées avec une modification de la régénération cellulaire, puisque ces zones contiennent les cellules progénitrices permettant la régénération des cellules sensorielles (récepteurs voméronasaux 1 et 2).

L'exposition à l'acétone entraîne des modifications des trois épaisseurs mesurées (supérieure, médiane, inférieure), cette évolution s'accompagnant d'une augmentation du nombre de cellules dans la zone médiane en fin d'exposition, tandis que l'exposition à la pyridine n'a pas d'effet sur l'épaisseur inférieure de l'épithélium de l'organe voméronasal et que l'épithélium médian semble peu touché. Concernant l'exposition au toluène, les mesures moyennes des trois épaisseurs suivent la même évolution au cours de l'expérimentation dans le sens d'une augmentation. Les résultats de l'exposition au CO<sub>2</sub> (12h) indiquent que l'épaisseur des trois zones diminue conjointement en fin de période de post-exposition (S4) puis augmente pendant la période de post-exposition (S6/S8)

## **Chapitre III :** **Discussion et Perspectives**

## Discussion

Conformément aux études toxicologiques menées sur d'autres systèmes physiologiques, les résultats obtenus dans ce travail de thèse montrent qu'en fonction des molécules inhalées et des conditions d'exposition, les effets observés sur la chimioréception nasale sont diversifiés. Toutefois, si l'hétérogénéité des résultats est importante dans le cas de l'approche comportementale, certaines concordances sont enregistrées au niveau histologique et une bonne homogénéité des données immunohistochimiques est notée.

De façon générale, les résultats obtenus dans les différentes expérimentations menées dans cette thèse ont permis de confirmer notre première hypothèse de travail, à savoir que les effets observés sur l'épithélium olfactif dépendent de la molécule d'exposition. De plus, nous avons pu tester notre deuxième hypothèse et montrer qu'en fonction de la substance d'exposition, les effets sur l'épithélium olfactif sont dose dépendants, comme c'est le cas pour le toluène par exemple, mais ne l'est pas pour la pyridine. Les mesures immunohistochimiques nous permettent de réfuter notre troisième hypothèse de travail. Nous avons postulé que l'exposition à une molécule volatile toxique entraînait une perte de neurones récepteurs olfactifs. Or les mesures réalisées ont révélé au contraire une augmentation du nombre de neurones matures avec une diminution du nombre de cellules basales en division, soulignant ainsi un effet sur la prolifération cellulaire au sein de l'épithélium olfactif. Enfin, la quatrième hypothèse a été confirmée, puisque l'atteinte cellulaire au niveau de l'épithélium de l'organe voméronasal est moins importante que celle mesurée dans l'épithélium olfactif, certainement expliqué en grande partie par le positionnement anatomique protégé de cet organe.

Sur ces bases, les résultats seront discutés selon les trois approches retenues : comportementale, histologique et immunohistochimique.

**D'un point de vue comportemental**, les tests contrôles réalisés en l'absence d'exposition à une substance toxique ne montrent pas d'effets liés à la répétition. Ainsi, lorsque des modifications sont observées dans les tests d'approche/évitement lors des expositions, elles sont majoritairement imputables aux effets de l'inhalation prolongée. Les effets lors de l'exposition à un polluant étant fortement dépendants de la dose inhalée (Newton *et al.*, 2002; Katagiri *et al.*, 2000), il est possible que les concentrations utilisées dans ce travail de thèse ne soient peut-être pas toujours suffisantes pour induire des modifications significatives du comportement approche/évitement comme c'est le cas avec la pyridine,

par exemple, puisque que les concentrations d'exposition ne sont pas massives. Dans le cas contraire, bien que les modifications soient hétérogènes tant en ce qui concerne les molécules utilisées que l'évolution au cours d'une même exposition, il apparaît que les modifications comportementales évoluent plutôt dans le sens d'une augmentation de l'évitement pour les odeurs testées à caractère répulsif comme c'est la cas par exemple pour la réponse comportementale vis-à-vis de l'acétone lors de l'exposition à cette même molécule et apparaissent mineures pour l'odeur d'urine de congénère réputée attractive.

Concernant l'augmentation de l'évitement vis-à-vis d'odeurs répulsives en cours d'exposition, deux explications peuvent être avancées. La première concerne le caractère systématiquement irritant des molécules toxiques utilisées qui activent donc le système trigéminale dans la cavité nasale. La persistance des stimulations sur ce système sensoriel produit des phénomènes de sensibilisation (Brand, 2006) en lien avec les fonctions d'alerte et de défense de l'organisme qui pourraient être à l'œuvre ici. Dans ce cas, les réponses comportementales adaptatives des animaux ne présagent pas des modifications potentielles au niveau de l'épithélium olfactif. En revanche, la seconde explication possible concerne l'augmentation du nombre de neurones olfactifs – fréquemment observée en cours d'exposition - et susceptible de provoquer une élévation de la réactivité des animaux vis-à-vis des odeurs testées.

Concernant l'absence d'effet comportemental vis-à-vis de l'odeur d'urine, il est désormais admis que le système olfactif principal et le système olfactif accessoire participent à une détection complémentaire des odeurs conspécifiques et même d'autres odeurs plus générales indiquant la présence de nourriture, par exemple (Kelliher, 2007 ; Sipos *et al.*, 1994 ; Ma, 2007 ; Spehr *et al.*, 2006). Par rapport à nos résultats, soit les effets de l'inhalation ne sont pas suffisants pour modifier le comportement d'approche/évitement vis-à-vis de l'urine de congénère, soit si l'un des systèmes est affecté, il est possible que l'autre puisse « compenser » la perte fonctionnelle.

**D'un point de vue tissulaire**, bien qu'il soit difficile de généraliser les modifications structurales induites par les différentes substances toxiques utilisées, l'épaisseur de l'épithélium olfactif diminue assez régulièrement au cours des périodes d'exposition et tend à retrouver son épaisseur d'origine lors des périodes de post-exposition. Précédent cette diminution, pour les expositions à la pyridine et au toluène, une augmentation de l'épaisseur est d'abord relevée en tout début d'exposition. Cette augmentation initiale de l'épaisseur est probablement liée à un processus inflammatoire que des études ultérieures

utilisant des marqueurs d'inflammation pourraient confirmer. Cette augmentation initiale ne concerne toutefois pas l'exposition au CO<sub>2</sub>. De même, en cours d'exposition au CO<sub>2</sub>, le nombre de cellules, quel que soit le phénotype, tend à augmenter alors qu'il diminue lors des expositions à la pyridine et au toluène après une augmentation en début d'exposition, synchrone avec l'augmentation de l'épaisseur mentionnée précédemment. Les études menées dans cette thèse se sont également intéressées aux modifications tissulaires en fonction des zones – postérieure, médiane et antérieure- de l'épithélium olfactif. Les résultats indiquent des variations de l'épaisseur et du nombre de cellules de l'épithélium olfactif en fonction des zones. Pour les trois expérimentations menées sur une courte durée, on peut remarquer que l'épaisseur des zones médiane et antérieure suit la même évolution au cours de l'expérimentation. De même, et le nombre total de cellules de l'épithélium olfactif varie de façon comparable dans les zones médiane et antérieure. Pour ces deux paramètres, une autre dynamique d'évolution est observée dans la zone postérieure de l'épithélium olfactif. Les mesures histologiques par zone de l'épithélium olfactif obtenues dans ce travail de thèse amènent des conclusions différentes par rapport à d'autres études menées avec des solvants et des aldéhydes révélant que la sévérité des lésions de l'épithélium olfactif, comme des oedemes ou des diminution de l'épaisseur de l'épithélium olfactif, suit un gradient antéro-postérieur (Monticello *et al.*, 1991 ; Abdo *et al.*, 1998 ; Newton *et al.*, 2002). En effet, dans ces études, il est montré que les lésions entraînées par l'inhalation d'agents xénobiotiques sont majoritaires au niveau de la partie antérieure de l'épithélium olfactif. Cependant, il a été montré par des mesures électrophysiologiques que la zone antérieure, première zone de l'épithélium olfactif à être en contact avec l'air inspiré, est plus sensible aux molécules hydrophiles, et que la zone postérieure répondait plus aux molécules hydrophobes (Scott *et al.*, 2000 ; Yang *et al.*, 2007). Les solvants possédant à la fois un caractère hydrophile et lipophile, il n'est donc sans doute pas surprenant d'observer dans ce travail de thèse une atteinte des différentes zones de l'épithélium olfactif. En revanche, les résultats de nos études ont révélés des modifications tissulaires identiques dans les zones médiane et antérieure de l'épithélium olfactif. On peut alors émettre l'hypothèse que ces deux zones possèdent une activité métabolique, et donc des enzymes de biodégradation comparables.. Des phénomènes de nécrose (Abdo *et al.*, 1998 ; Cruzan *et al.*, 2001) et d'apoptose (Vent *at.*, 2004) sont probablement à la base des pertes cellulaires observées comme cela a déjà été montré sur l'épithélium olfactif de rongeurs lors de l'exposition à différents solvants, comme le chloroforme (Larson *et al.*, 1994), l'alcool furfurylique (Irwin *et al.*, 1997) , le méthylisocyanate (Uraih *et al.*, 1987),

ou encore le perchloroéthylène (Aoki *et al.*, 1994). Des études menées avec des gaz atmosphériques, comme le dioxyde de soufre (Min *et al.*, 1994), l'ozone (NTP, 1994) ou le sulfure d'hydrogène (Brenneman *et al.*, 2002), ont également montré des lésions au niveau de l'épithélium olfactif. Plus précisément, une exposition de 3 heures à 80 ppm de sulfure d'hydrogène induit une nécrose de la muqueuse olfactive, et une exposition aiguë à 400 ppm un gonflement mitochondrial dans les neurones olfactifs et les cellules de soutien. Des oedèmes, des pertes de cils olfactifs et une diminution de l'épaisseur de l'épithélium olfactif sont observés lors de l'exposition à 20 ppm de dioxyde de soufre sur une durée de une à deux heures.

Enfin, il est très probable que les modifications histologiques observées au niveau de l'épithélium olfactif soient reliées ou dépendantes de modifications touchant les autres épithéliums présents dans la cavité nasale épithéliums squameux, transitionnel et respiratoire (Morgan, 1991; Aoki *et al.*, 1994 ; Harkema *et al.*, 1987a, Harkema *et al.*, 1987b) qui n'ont pas fait l'objet d'investigations dans cette thèse.

**D'un point de vue phénotypique cellulaire**, la décroissance du nombre de cellules basales en division fréquemment observée pendant les périodes d'exposition se poursuit en période de post-exposition. A l'inverse, une augmentation significative du nombre de neurones olfactifs matures est généralement observée en période d'exposition – sauf dans le cas de l'acétone - augmentation qui suivant les cas peut, soit se maintenir à ce niveau en période de post-exposition – dans le cas du toluène, de la pyridine et du CO<sub>2</sub> en courte exposition - soit décroître, dans le cas de l'exposition longue durée au CO<sub>2</sub>. L'évolution inverse du nombre de cellules basales en division et du nombre de neurones matures peut paraître paradoxale. L'explication la plus probable est que les effets produisent des modifications cellulaires très précoces et qu'ainsi les mesures effectuées lors de la deuxième semaine d'exposition (S2, en courte exposition) ou lors de la quatrième semaine d'exposition (S4, en longue exposition) sont le résultat d'une activité mitotique importante dès les premiers jours d'exposition conduisant à une élévation du nombre de neurones matures, ce nombre important expliquant alors le faible taux de cellules basales en division. La conclusion majeure est que l'inhalation des molécules utilisées ne produit pas d'effets délétères sur les neurones matures et ce quelle que soit la durée d'exposition. Ces résultats sont à mettre en lien avec les mesures comportementales effectuées pour chaque type d'exposition. En effet, comme cela a été signalé précédemment, l'augmentation du

nombre de neurones olfactifs matures pourrait expliquer l'augmentation du comportement d'évitement des souris vis-à-vis des odeurs répulsives testées.

Afin d'affiner les résultats immunohistochimiques, le marquage d'autres types cellulaires pourraient être envisagés, en particulier les cellules de soutien, le marquage de ces cellules pouvant être réalisé par l'anticorps 1F4 (Pixley *et al.*, 1997) ou les neurones olfactifs immatures, grâce au marqueur GAP43. L'étude des glandes de Bowman, site de forte activité enzymatique, pourrait également apporter des informations complémentaires. Il a en effet été montré que l'exposition à divers composés toxiques, comme le benzène, conduisait à une dégénération et une nécrose des glandes de Bowman (Brittebo *et al.*, 1990). Il serait également pertinent de conduire diverses expérimentations sur les facteurs impliqués dans l'induction, la différenciation et la survie des neurones récepteurs olfactifs. Par exemple, il pourrait être envisagé l'évaluation du FGF-2 qui stimule la prolifération des cellules basales globulaires, du TGF  $\beta$ 2 qui induit la différenciation de ces cellules en neurones récepteurs olfactifs, et le PGF qui favorise la survie des neurones récepteurs olfactifs différenciés (Newman *et al.*, 2000). Des études *in vitro* pourraient également être réalisées par culture cellulaire. Après prélèvement de l'épithélium olfactif, puis dissociation des cellules, et mise en culture, un polluant pourrait être introduit directement dans le milieu de culture, des tests de viabilité cellulaire étant réalisés à différents temps et différentes concentrations. Une étude de ce genre menée au Laboratoire de Neurosciences de Besançon a montré des modifications de la prolifération cellulaire en fonction du temps et de la concentration en acétate de n-butyle (Renaud, 2006, données non publiées). Ces expérimentations peuvent cependant soulever certaines difficultés en raison de la faible solubilité dans l'eau ainsi que la forte pression de vapeur, deux caractéristiques physico-chimiques principales de la plupart des composés organiques volatiles devant être prise en compte lors de la réalisation de tests *in vitro*. Pour éviter ces problèmes, de nouvelles techniques basées sur des expositions statiques directes de cellules en culture sur des membranes poreuses dans des « snapwell inserts » pour tester la toxicité des composés organiques volatiles ont été récemment développées (Bakand *et al.*, 2005) et pourraient être applicables aux solvants étudiés dans cette thèse.

**Au niveau de l'organe voméronasal**, les résultats des expérimentations menées dans cette thèse mettent en évidence des modifications histologiques avec toutes les molécules utilisées. Malgré sa position anatomique, des variations de l'épaisseur ainsi que du nombre total de cellules sont enregistrées pour chaque polluant testé. Ceci démontre l'accès des

molécules toxiques au niveau périphérique du système voméronasal, même si globalement les modifications paraissent moins conséquentes que celles enregistrées au niveau de l'épithélium olfactif principal, notamment en ce qui concerne la densité cellulaire. Dans la zone médiane de l'épithélium de l'organe voméronasal, où se trouvent les cellules matures, une diminution du nombre de cellules et de l'épaisseur de l'épithélium voméronasal est systématiquement enregistrée. Les modifications sont réversibles puisque ces paramètres retournent à des valeurs comparables à celles mesurées avant exposition en fin de période de post-exposition. Ce n'est pas le cas pour les zones de prolifération cellulaire (zones supérieure et inférieure), situées aux extrémités de l'épithélium voméronasal, puisqu'une diminution de l'épaisseur est mesurée pendant l'exposition aux différentes molécules utilisées qui ne retrouve pas sa valeur initiale en fin d'expérimentation.

Les mesures histologiques sur le système voméronasal réalisées dans ce travail de thèse se rapprochent des résultats obtenus dans la seule étude de toxicité menée sur l'organe voméronasal trouvée dans la littérature. Cette étude menée par Gaffar *et al.* (1998) porte sur les effets de l'inhalation d'ammoniac sur les épithéliums olfactif et voméronasal du lapin. Les résultats de cette étude indiquent une hyperplasie des cellules de soutien dans les deux types d'épithéliums, ce phénomène cellulaire étant plus marqué dans l'épithélium olfactif. De plus, une certaine cytotoxicité est mesurée au niveau des neurones olfactifs, et de façon moindre dans les cellules de l'épithélium de l'organe voméronasal du fait de sa position anatomique qui a probablement un rôle protecteur vis-à-vis des substances volatiles présentes dans l'air inspiré.

Comme pour l'épithélium olfactif principal, des études immunohistochimiques de l'organe voméronasal pourraient utilement compléter les données histologiques. Des marquages des récepteurs voméronasaux 1 et 2 permettraient de déterminer si ces deux types cellulaires de l'épithélium de l'organe voméronasal sont atteints lors de l'exposition à un polluant et à quel degré. En effet, il a été montré par microscopie par force atomique et observations immunohistochimiques que les cellules de l'organe voméronasal expriment l'OMP (Kim *et al.*, 2007). De plus, les résultats de nos études menées sur l'organe voméronasal montrent des modifications d'épaisseur des zones supérieure et inférieure, ces zones représentant des sites de prolifération cellulaire visant à remplacer les neurones de l'organe voméronasal lors des processus de dégénérescence. Afin d'étudier plus précisément les mécanismes de dégénération/régénération cellulaire dans le système olfactif accessoire, des marquages de cellules prolifératrices, comme cela a été effectué dans le système olfactif principal en utilisant le PCNA, pourraient aussi être envisagés.

D'un point de vue comportemental, des données récentes suggèrent que certaines réponses provoquées par des phéromones sont en partie médiées par le système olfactif principal. Il a ainsi été montré par des mesures en imagerie par résonance magnétique fonctionnelle que les neurones du bulbe olfactif répondent à l'urine de souris (Xu *et al.*, 2005) et que les cellules mitrales sont activées par le methanethiol, une phéromone potentielle, retrouvée dans l'urine de souris mâle (Lin *et al.*, 2005). Il a également été montré que l'ablation de l'organe voméronasal n'altère pas la capacité des souris à discriminer les mâles des congénères femelles (Keller *et al.*, 2006). Puisque les résultats de ce travail de thèse montrent des modifications de l'épithélium olfactif et de l'épithélium de l'organe voméronasal, il est difficile de déterminer pourquoi ces modifications n'influencent pas ou peu les comportements d'approche/évitement vis-à-vis de l'odeur d'urine. Des expériences complémentaires s'avèrent donc nécessaires notamment des études qui permettraient d'isoler chaque système d'un point de vue fonctionnel. Par exemple, le traitement par le sulfate de zinc est connu pour détruire les cellules de l'épithélium olfactif et provoquer une anosmie transitoire apparaissant trois jours après le traitement (Matulionis, 1975 ; Burd, 1993 ; McBride *et al.*, 2003). Cette expérimentation consiste en une injection de sulfate de zinc dans chaque narine de l'animal. Cependant, ce traitement n'atteignant pas la lame basale de l'épithélium olfactif, une régénération des cellules de l'épithélium olfactif est possible. L'injection de sulfate de zinc est également connue pour ne pas atteindre l'organe voméronasal. Ainsi, ce traitement permettrait de conserver la fonctionnalité du système olfactif accessoire, tout en rendant transitoirement non fonctionnel le système olfactif principal. Suite à ce traitement, des expositions aux molécules retenues dans cette thèse pourraient alors être réalisées en comparaison avec des animaux pour lesquels, à l'inverse l'intégrité du système olfactif principal serait maintenue et dont l'organe voméronasal ne serait pas fonctionnel. Dans ce cadre, il pourrait être envisagé soit l'utilisation de souris knock-out, souris ayant subi une modification génétique par désactivation d'un gène pour le canal sensoriel de transduction TRPC2 (Zufall *et al.*, 2005, Leybold *et al.*, 2002), ce canal jouant un rôle fondamental dans la détection de signaux phéromonaux par l'organe voméronasal, soit l'ablation chirurgicale de l'organe voméronasal, par incision au niveau du palais et extraction du vomer puis de l'organe voméronasal comme cela a déjà été décrit dans la littérature (Wysocki *et al.*, 2004).

## **Perspectives**

*D'un point de vue méthodologique*, toutes les études conduites dans cette thèse ont été menées avec des souris OF-1 femelles, âgées de trois mois au début de l'expérimentation, dans le but de constituer un groupe homogène d'individus adultes. Les comportements et les performances olfactives dépendant du genre, de l'âge et de la souche des animaux (Nagano *et al.*, 1997), il serait donc intéressant de répéter les différentes expérimentations sur des souris femelles d'âges différents, des souris mâles de même souche (afin d'éviter les fluctuations liées au cycle oestrien), et des animaux jeunes, afin de comparer les résultats avec ceux obtenus avec des souris (mâles et femelles) d'autres souches. De plus, comme l'indiquent les résultats de nos études et d'autres travaux menés sur d'autres polluants atmosphériques, si l'exposition à un polluant a des effets néfastes sur le système olfactif des souris, il est possible que d'autres systèmes physiologiques soient touchés. Dans cette problématique de recherche, suite à l'exposition à différentes substances, de nombreuses études ont montré des effets délétères au niveau pulmonaire, hépatique ou cardiaque. Par exemple, l'exposition au styrène entraîne des tumeurs au niveau des bronchioles (Cruzan *et al.*, 2002), ainsi que des nécroses du foie (Morgan *et al.*, 1993). L'exposition au méthane conduit à des dysfonctionnements mitochondriaux aboutissant à une toxicité cardiaque (Dunnick *et al.*, 2004). L'exposition au dioxyde d'azote (NO<sub>2</sub>) sur une longue période induit des inflammations pulmonaires, suivies d'une obstruction progressive des voies respiratoires (Wegmann *et al.*, 2002). Les informations toxicologiques les plus pertinentes sont sans doute les données qui combinent les informations relatives aux effets de l'exposition à un polluant à différents niveaux (pulmonaire, hépatique, cardiaque...). A cet égard, des travaux sur les effets conjoints des solvants utilisés ici au niveau nasal et cutané sont en cours d'étude dans notre laboratoire.

*Au niveau comportemental*, les études présentées dans cette thèse se sont focalisées sur le comportement d'approche/évitement des souris pour différents types d'odeur, ces tests étant réalisés en corridor. Pour compléter les résultats obtenus, d'autres évaluations comportementales pourraient être envisagées dans des structures variées. Par exemple, la vitesse, la distance à l'odeur ou l'immobilité pourraient être mesurées par des tests en openfield circulaire (enceinte permettant l'enregistrement de l'activité générale de l'animal). Une étude sur les changements comportementaux lors de l'exposition à divers solvants industriels a montré une réduction de la durée totale d'immobilité (De Ceauriz *et*

*al.*, 1983). L'évaluation de l'activité motrice pourrait également être envisagée. Ce paramètre a été mesuré dans une étude menée par Kjellstrand *et al.* (1985). Les résultats ont montré des altérations de l'activité motrice lors de l'exposition par inhalation à des solvants organiques, les patterns d'altérations étant spécifiques à chaque solvant. Comme pour les effets histologiques sur la muqueuse olfactive, les auteurs concluent que les différences observées entre les solvants reflètent probablement les différences dans leur site d'action, leur distribution et leur biotransformation. Dans ce sens, Carlsson *et al.* (2003) ont montré une augmentation de l'activité motrice, avec une altération des performances d'apprentissage réalisées grâce à un test en labyrinthe radial (structure permettant l'évaluation de l'apprentissage spatial et de la mémoire chez l'animal) suite à l'exposition au 2,6-dichlorophényl méthylsulphone. De façon complémentaire, des évaluations de l'apprentissage impliquant l'hippocampe ou non peuvent être réalisées par l'utilisation de labyrinthes aquatiques ou de dispositifs d'apprentissage conditionné. Des tests utilisant un labyrinthe en forme de croix surélevée permettraient d'évaluer un paramètre important, l'anxiété. Dans le cadre de l'étude des effets d'abus volontaires de substances volatiles par inhalation, qui constitue un problème de santé publique mondial, Bowen *et al.* (1996) ont évalué le comportement des souris dans un elevated-plus-maze. Les auteurs ont ainsi montré un effet anxiolytique de l'inhalation de toluène et de 1,1,1-trichloroéthane. Des tests similaires ont également souligné que l'abus de protoxyde d'azote ou oxyde nitreux (N<sub>2</sub>O) produit des effets anxiolytiques dépendant de la concentration chez des rats testés en elevated-plus-maze (Emmanouil *et al.*, 1994).

L'effet de substances toxiques sur les systèmes olfactifs (principal et/ou accessoire) peut avoir des conséquences en terme d'adaptation. Il peut s'agir notamment de perturbations dans les relations entre congénères, par des difficultés à repérer les sources de nourriture ou la présence de prédateurs. Chez de nombreuses espèces animales, la détection de prédateurs se fait conjointement par le système olfactif principal et le système olfactif accessoire. Les odeurs de prédateurs sont des signaux entraînant des comportements innés de peur (comme l'immobilité ou le freezing) et des réponses physiologiques (une augmentation du taux de corticostérone sanguin par exemple). Dans le cadre de notre étude sur les effets de l'exposition des souris au CO<sub>2</sub>, nous avons choisi de tester en corridor l'odeur de triméthylthiazoline comme indice de prédateur. Actuellement, l'utilisation de cette molécule synthétique fait débat, et la question de sa toxicité potentielle et sa perception par le système trigéminal, plutôt que son état d'indice de prédateur est soulevée. Pour répondre à cette question, des expositions de courtes durées suivies de mesures

comportementales ont été réalisées au sein de notre laboratoire (Buron *et al.*, 2007, ANNEXE 4). Ainsi, par des tests utilisant diverses structures, telles que l'open-field circulaires, l'elevated-plus-maze et le corridor, il a été montré que le triméthylthiazoline entraîne des réponses comportementales similaires à celles obtenues avec d'autres produits irritants, comme le toluène par exemple. En revanche, il n'entraîne pas de réponse de freezing ou d'anxiété. Dans la plupart des études menées sur la peur, le triméthylthiazoline est utilisé de façon pure. Il semble que les comportements d'évitement soient dus à la concentration en triméthylthiazoline, reliant les effets dose-dépendant observés avec la plupart des polluants et des solvants. De plus, il est probable que le triméthylthiazoline n'active pas seulement le système olfactif, mais également le système trigéminal. Dans le cadre de recherches récentes, il a en effet été montré des interactions entre le système olfactif et le système trigéminal (Jacquot *et al.*, 2004 ; Brand, 2006) dans la perception des molécules présentes dans l'air inhalé. Il serait alors intéressant de déterminer les parts respectives du système trigéminal et du système olfactif principal impliquées lors de la perception de substances volatiles toxiques.

Les molécules de communications intraspécifiques, comme les phéromones, sont relâchées dans l'atmosphère, et rentrent en contact avec d'autres composés présents dans l'air. D'un point de vue écotoxicologique se pose la question de savoir si les polluants atmosphériques réagissent avec les phéromones, ce qui pourraient avoir des conséquences écologiques et économiques. Les quelques études menées dans cette optique portent sur les phéromones d'insectes. Elles ont montré des effets destructeurs de fortes concentrations en ozone sur les phéromones (Okamoto, 1981), et des pertes de l'activité biologique des phéromones après des expositions de courte durée à l'ozone dans les concentrations environnementales (Arndt, 1995). Ces études préliminaires ouvrent la voie à d'autres recherches dans ce domaine, notamment par l'observation des interactions d'un ou plusieurs polluants atmosphériques avec les phéromones des mammifères afin de prévoir d'éventuels effets sur le comportement animal en relation avec la pollution atmosphérique. Shiraiwa *et al.* (2007) ont montré, par évaluation de réponses mesurées par le gène précoce d'activation cellulaire (Fos) dans le bulbe olfactif accessoire, que l'exposition à un polluant aromatique environnemental, le 3-méthylchloranthrène, bloquait la communication chimique des souris mâles aux souris femelles en réduisant l'activité phéromonale.

*Au niveau cellulaire*, au-delà des évaluations histologiques et immunohistochimiques utilisées dans ce travail, d'autres techniques, notamment électrophysiologiques pourraient être envisagées. Ainsi, la technique du patch-clamp permet de tester certaines propriétés fonctionnelles des récepteurs olfactifs et voméronasaux lors de la présence de polluants. De même, l'enregistrement d'une réponse globale par électro-olfacto-gramme au niveau extracellulaire d'une population de neurones récepteurs olfactifs permet d'indiquer les changements de potentiels membranaires induits par les molécules odorantes au niveau des cils olfactifs. L'exposition aiguë au styrène et au toluène par exemple a révélé par électro-olfacto-gramme des changements ultrastructuraux de l'épithélium olfactif avec une augmentation de la sécrétion des cellules de soutien ainsi qu'une fusion des membranes ciliaires (Ekblom *et al.*, 1984).

Au niveau cellulaire, l'étude d'autres niveaux d'intégration de l'information olfactive que le système périphérique sont nécessaires. En effet, les mécanismes de lésions du système olfactif par des produits chimiques au-delà de la muqueuse, bulbe olfactif et cortex olfactifs (piriforme et entorhinal) sont peu connus. Dans une étude pionnière menée sur le formaldéhyde, Hayashi *et al.* (2003) ont montré que l'exposition sur une longue durée à ce composé organique entraînait des modifications histologiques au niveau du bulbe olfactif pouvant affecter sa fonction neuronale.

Il est maintenant accepté que de nombreux médicaments et agents xénobiotiques potentiellement toxiques peuvent atteindre le système nerveux central via le système olfactif (Minn *et al.*, 2002). Le système olfactif possède alors une fonction non sensorielle, représentant un mécanisme d'entrée dans le système nerveux central de composés normalement exclus de la barrière hémato-encéphalique (Hastings, 1990). Persson *et al.* (2003) ont montré que l'inhalation de fumée ou de poussières contenant du cobalt entraîne un passage de ce métal lourd dans la muqueuse olfactive, une accumulation dans le bulbe olfactif et un transport dans diverses structures cérébrales, conduisant à des déficits mnésiques chez des ouvriers exposés à ce composé. Cependant, les métaux lourds toxiques ont plus de difficulté à passer la barrière hémato-encéphalique contrairement aux gaz et aux solvants qui accèdent facilement au système olfactif par la circulation systémique (Hastings et Miller, 2003). En outre, en raison de la nature fortement vascularisée de la cavité nasale, l'exposition à des substances toxiques fournit un accès à la circulation systémique, conduisant à une destruction possible de tissus cérébraux, incluant le bulbe olfactif.

*Au niveau des composants toxiques*, l'air inspiré contient de nombreux éléments, incluant des particules et des substances chimiques très diverses. Pourtant, la plupart des études menées sur les effets de l'inhalation d'une substance toxique sur l'organisme animal, et en particulier sur le système olfactif périphérique, portent sur l'exposition à une seule molécule. Afin de se rapprocher de la réalité écologique, des études sur l'exposition à des mélanges de polluants pourraient se révéler judicieuses. Dans cette optique de recherche, quelques travaux ont été menés sur des mélanges d'aldéhydes (Casseo *et al.*, 1996) ou des mélanges gazeux (Ichinose et Sagai, 1992), indiquant des augmentations d'altérations en fonction de la présence d'un composé. De plus, le modèle animal expérimental a été utilisé comme indicateur biologique des effets de niveau de pollution urbaine sur la santé humaine. Des études menées sur des sites localisés dans certaines grandes agglomérations ont montré des effets néfastes de la pollution sur le système respiratoire des rongeurs, mais également des humains, pour des villes comme Sao Paulo (Pires-Neto *et al.*, 2006), Mexico (Calderón-Garcidueñas *et al.*, 2008), Soweto (Kristensen et Olsen, 2006), Bangkok (Preuthipan *et al.*, 2004), ou Florence (Pacini *et al.*, 2003).

De la même façon, l'effet des gaz atmosphériques sont peu étudiés et à l'instar du CO<sub>2</sub> retenu dans cette thèse. Plusieurs études prédisent que le taux global de CO<sub>2</sub> excédera les limites de détection chez le rongeur d'ici un siècle (Cox *et al.*, 2000) et une augmentation des taux de CO<sub>2</sub> pourra alors avoir des impacts écologiques et éthologiques sur le comportement des mammifères (Hu *et al.*, 2007). Les études réalisées dans le cadre des expositions au CO<sub>2</sub> comparent les effets de l'exposition pour une même concentration (3%) suivant deux conditions d'exposition (5heures/jour ou 12heures/jour). Il a été montré (Krohn et Hansen, 2000) que les effets physiologiques entraînés par de fortes concentrations en CO<sub>2</sub>, de l'ordre de 15%, sont les mêmes que ceux observés à 3%, c'est-à-dire une diminution des valeurs du pH sanguin, une augmentation du volume respiratoire par minute et du volume tidale, et une augmentation de la sécrétion de corticostérone. La majorité des études portant sur le CO<sub>2</sub> ne se sont focalisées que sur des paramètres respiratoires et physiologiques, mais peu se sont intéressées aux effets sur le système olfactif, et aucune n'a mis en évidence des effets toxicologiques au niveau de l'épithélium olfactif. Les travaux réalisés lors de cette thèse ont permis de montrer des effets délétères de l'exposition au CO<sub>2</sub> sur l'épithélium olfactif et l'épithélium de l'organe voméronasal (avec une augmentation du nombre de cellules et une diminution de l'épaisseur des épithéliums pendant la phase d'exposition), au cours d'expositions conduites sur 5 heures par jour ou 12 heures par jour. Yougentob *et al.* (1990) ont montré que des rats peuvent

détecter des concentrations en CO<sub>2</sub> autour de 0,5%. Suite à des études préliminaires menées dans les années 1990 (Youngentob *et al.*, 1991 ; Alvaro *et al.*, 1993 ; Coates et Silvis, 1999), il a récemment été montré (Hu *et al.*, 2007) que les souris possèdent un "sous-système" olfactif permettant de détecter des concentrations en CO<sub>2</sub> proches des concentrations atmosphériques. Les neurones olfactifs impliqués dans cette détection expriment la phosphodiesterase ainsi que la guanylyl cyclase D. Ces neurones contiennent l'anhydrase carbonique, une enzyme qui catalyse l'hydratation réversible du CO<sub>2</sub> en bicarbonate et protons, suggérant un rôle possible de cette enzyme dans les mécanismes de transduction des récepteurs au CO<sub>2</sub> (Coates, 2001 ; Ferris *et al.*, 2007). Des mesures plus approfondies sur les réponses des cellules de l'épithélium olfactif, et en particulier des neurones impliqués dans la détection de CO<sub>2</sub> lors d'exposition à diverses concentrations et durées d'exposition au CO<sub>2</sub>, ainsi que de plus amples travaux sur l'anhydrase carbonique, permettraient de mieux comprendre le mécanisme de détection de ce polluant atmosphérique, ainsi que sa toxicité potentielle sur le système olfactif principal et le système olfactif accessoire.

L'effet d'autres gaz atmosphériques pourraient être étudié. L'ozone, par exemple est un polluant secondaire bien connu, dont les concentrations observées sont plus importantes en zones périurbaines, où vivent de nombreuses espèces animales. Des recherches futures pourraient avoir comme objectif d'évaluer les effets de l'exposition à l'ozone sur le système olfactif accessoire de la souris, afin de prévoir d'éventuelles modifications structurelles et fonctionnelles, conduisant dans le cas d'effets néfastes à des impacts sur le comportement animal, et sur les relations intraspécifiques. Dans la même optique de recherche, les travaux conduits sur les effets de la pollution atmosphérique pourraient s'orienter vers l'évaluation des perturbations entraînées par divers polluants sur les systèmes chimiosensoriels présents dans la cavité nasale à différentes échelles : locale, de l'organisme, du comportement, des relations intraspécifiques puis interspécifiques, et enfin à l'échelle de l'écosystème dans le but d'approfondir et de compléter les connaissances déjà acquises, et d'avoir alors une idée globale des effets entraînés par une exposition à des agents xénobiotiques.

## **Bibliographie**

Abdo K.M., Haseman J.K., Nyska A. (1998). Isobutyraldehyde administered by inhalation (whole body exposure) for up to thirteen weeks or two years was a respiratory tract toxicant but was not carcinogenic in F344/N rats and B6C3F1 mice. *Toxicological Sciences*, 42: 136-151.

Ache B.W., Young J.M. (2005). Olfaction: diverse species, conserved principles. *Neuron*, 48: 417-430.

Adams D.R., Jones A.M., Plopper C.G., Serabjit-Singh C.J., Philpot R.M. (1991). Distribution of cytochrome P-450 monooxygenase enzymes in the nasal mucosa of hamster and rat. *American Journal of Anatomy*, 190: 291-298.

Alvaro R.E., De Almeida V., Kwiatkowski K., Cates D., Kryger M., Rigatto H. (1993). A developmental study of dose-response curve of the respiratory sensory reflex. *American Review of Respiratory Disease*, 148: 1013-1017.

Amoore J.E., Hautala E. (1983). Odor as an aid to chemical safety: odor thresholds compared with threshold limit values and volatilities for 214 industrial chemicals in air and water dilution. *Journal of Applied Toxicology*, 3: 272-290.

Aoki A., Suzaki H., Kawabata Y., Nomura Y. (1994). Effect of perchloroethylene inhalation on nasal mucosa in mice. *European Archives of Otorhinolaryngology*, 251: 361-365.

Apfelbach R. (1991). Sensitivity to odors in Wistar rats is reduced after low-level formaldehyde gas exposure. *Naturwissenschaften*, 78: 221-223.

Appelman L.M., Woutersen R.A., Feron V.J. (1982). Inhalation toxicity of acetaldehyde in rats. I. Acute and subacute studies. *Toxicology*, 23: 293-307.

Armstrong R.N. (1997). Structure, catalytic mechanism, and evolution of the glutathione transferases. *Chemical Research in Toxicology*, 10: 2-18.

Arndt U. (1995). Air pollutants and pheromones – a problem? *Chemosphere*, 30: 1023-1031.

Bacchini A., Gaetani E., Cavaggioni A. (1991). Pheromone binding proteins of the mouse *Mus musculus*. *Experientia*, 48: 419-421.

Bakand S., Winder C., Khalil C., Hayes A. (2005). A novel in vitro exposure technique for toxicity testing of selected volatile organic compounds. *Journal of Environmental Monitoring*, 8: 100-105.

Banger K.K., Foster J.R., Lock E.A., Reed C.J. (1994). Immunohistochemical localisation of six glutathione S-transferases within the nasal cavity of the rat. *Archives of Toxicology*, 69: 91-98.

Barber P.C., Raisman G. (1978). Cell division in the vomeronasal organ of the adult mouse. *Brain Research*, 141: 57-66.

Barry P.H. (2003). The relative contributions of cAMP and InSP3 pathways to olfactory responses in vertebrate olfactory neurons and the specificity of odorants of both pathways. *Journal of General Physiology*, 122: 247-250.

Bascom R., Kesavanathan J., Fitzgerald T.K., Cheng K.H., Swift D.L. (1995). Sidestream tobacco smoke exposure acutely alters human nasal mucociliary clearance. *Environmental and Health Perspectives*, 103: 1026-1030.

Baum M.J., Keverne E.B. (2002). Sex difference in attraction thresholds for volatile odors from male and estrous female mouse urine. *Hormones and Behavior*, 41: 213-219.

Bertoni G., Ciuchini C., Tappa R. (2004). Measurements of long-term average carbon dioxide concentrations using passive diffusion sampling. *Atmospheric Environment*, 38: 1625-1630.

Boehm U. (2006). The vomeronasal system in mice: from the nose to the hypothalamus-and back!. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 17: 471-479.

Boehm U., Zou Z., Buck L.B. (2005). Feedback loops link odor and pheromone signaling with reproduction. *Cell*, 123: 683-695.

Bowen S.E., Wiley J.L., Balster R.L. (1996). The effects of abused inhalants on mouse behavior in an elevated plus-maze. *European Journal of Pharmacology*, 312: 131-136.

Brand G. (2006). Olfactory/trigeminal interactions in nasal chemoreception. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 30: 908-917.

Brand G. (2001). *L'olfaction: de la molecule au comportement*. Solal, Marseille.

Brandt I., Brittebo E.B., Feil V.J., Bakke J.E. (1990). Irreversible binding and toxicity of the herbicide dichlobenil (2,6-dichlorobenzonitrile) in the olfactory mucosa of mice. *Toxicology and Applied pharmacology*, 103: 491-501.

Brennan P.A. (2001). The vomeronasal system. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 58: 546-555.

Brenneman K.A., Meleason D.F., Sar M., Marshall M.W., James R.A., Gross E.A., Martin J.T., Dorman D.C. (2002). Olfactory mucosal necrosis in male CD rats following acute inhalation exposure to hydrogen sulfide: reversibility and the possible role of regional metabolism. *Toxicologic Pathology*, 30: 200-208.

Brittebo E.B. (1997). Metabolism-dependent activation and toxicity of chemicals in nasal glands. *Mutation Research*, 380: 61-75.

Brittebo E.V., Eriksson C., Brandt I. (1990). Activation and toxicity of bromobenzene in nasal tissue in mice. *Archives of Toxicology*, 64: 54-60.

Bruckner J.V., Peterson R.G. (1981). Evaluation of toluene and acetone inhalant abuse. II. Model development and toxicology. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 61: 302-312.

Buck L., Axel A. (1991). A novel multigene family may encode odorant receptors: a molecular basis for odour recognition. *Cell*, 65: 175-187.

Buckley L.A., Jiang X.Z., James R.A., Morgan K.T., Barrow C.S. (1984). Respiratory tract lesions induced by sensory irritants at the RD50 concentration. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 74: 417-429.

Burd G.D. (1993). Morphological study of the effects of intranasal zinc sulfate irrigation on the mouse olfactory epithelium and olfactory bulb. *Microscopy Research and Technique*, 24: 195-213.

Buron G., Hacquemand R., Pourie G., Lucarz A., Jacquot L., Brand G. (2007). Comparative behavioral effects between synthetic 2,4,5-trimethylthiazoline (TMT) and the odor of natural fox (*Vulpes vulpes*) feces in mice. *Behavioral Neuroscience*, 121: 1063-1072.

Caggiano M., Kauer J.S., Hunter D.D. (1994). Globose basal cells are neuronal progenitors in the olfactory epithelium: a lineage analysis using a replication-incompetent retrovirus. *Neuron*, 13: 339-352.

Cain W.S. (1976). Olfaction and the common chemical sense: some psychophysical contrasts. *Sensory Processes*, 1: 57-67.

Calderón-Garcidueñas L., Rodríguez-Alcaraz A., Villarreal-Calderon A., Lyght O., Janszen D., Morgan K.T. (1998). Nasal epithelium as a sentinel airborne environmental pollution. *Toxicological Sciences*, 46: 352-364.

Calof A.L., Bonnin A., Crocker C., Kawauchi S., Murray R.C., Shou J., Wu H.H. (2002). Progenitor cells of the olfactory receptor neuron lineage. *Microscopy Research and Technique*, 58: 176-188.

Canteras N.S. (2002). The medial hypothalamic defensive system: hodological organization and functional implications. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 71: 481-491.

Cappello P., Tarozzo G., Benedetto A., Fasolo A. (1999). Proliferation and apoptosis in the mouse vomeronasal organ during ontogeny. *Neuroscience Letters*, 266: 37-40.

Carlsson C., Fredriksson A., Brandt I. (2003). 2,6-dichlophenyl methylsulphone induced behavioural impairments in rats and mice in relation to olfactory mucosal metaplasia. *Pharmacology and Toxicology*, 93: 156-168.

Carr V.McM., Farbman A.J., Colletti L.M., Morgan J.I. (1991). Identification of a new non-neuronal cell type in the rat olfactory epithelium. *Neuroscience*, 45: 433-449.

Cassee F.R., Groten J.P., Feron V.J. (1996). Changes in the nasal epithelium of rats exposed by inhalation to mixtures of formaldehyde, acetaldehyde, and acrolein. *Fundamental and Applied Toxicology*, 29: 208-218.

Centre Interprofessionnel Technique d'Etudes de la Pollution Atmosphériques (2006). <http://www.citepa.org/index.htm>

- Chen Y., Getchell M.L., Ding X., Getchell T.V. (1992). Immunolocalization of two cytochrome P450 isozymes in rat nasal chemosensory tissue. *Neuroreport*, 3: 749-752.
- Choi G.B., Dong H.W., Murphy A.J., Valenzuela D.M., Yancopoulos G.D., Swanson L.W. (2005). Lhx6 delineates a pathway mediating innate reproductive behaviors from the amygdala to the hypothalamus. *Neuron*, 46: 647-660.
- Coates E.L. (2001). Olfactory CO<sub>2</sub> chemoreceptors. *Respiration Physiology*, 129: 219-229.
- Coates E.L., Silvis M.L. (1999). Age-related changes in the ventilatory response to inspired CO<sub>2</sub> in neonatal rats. *Respiration Physiology*, 118: 173-179.
- Cometto-Muñiz J.E., Hernandez S.M. (1990). Odorous and pungent attributes of mixed and an mixed odorants. *Perception and Psychophysics*, 47: 391-399.
- Cox P.M., Betts R.A., Jones C.D., Spall S.A., Totterdell I.J. (2000). Acceleration of global warming due to carbon-cycle feedbacks in a coupled climate model. *Nature*, 408: 184-187.
- Crofton K.M., Lassiter T.L., Rebert C.S. (1994). Solvent-induced ototoxicity in rats: an atypical selective mid-frequency hearing deficit. *Hear Research*, 80: 25-30.
- Cruzan G, Cushman JR, Andrews LS, Granville GC, Johnson KA, Bevan C, Hardy CJ, Coombs DW, Mullins PA, Brown WR. (2001). Chronic toxicity/oncogenicity study of styrene in CD-1 mice by inhalation exposure for 104 weeks. *Journal of Applied Toxicology*, 21: 185-198.
- Cruzan G., Carlson G.P., Johnson K.A., Andrews L.S., Banton M.I., Bevan C., Cushman J.R. (2002). Styrene respiratory tract toxicity and mouse lung tumors are mediated by CYP2F-generated metabolites. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 35: 308-319.
- Dahl AR, Coslett DS, Bond JA, Hesseltine GR. (1985). Metabolism of benzo[a]pyrene on the nasal mucosa of Syrian hamsters: comparison to metabolism by other extrahepatic tissues and possible role of nasally produced metabolites in carcinogenesis. *Journal of the National Cancer Institute*, 75: 135-139.
- Dahl A.R., Gerde P. (1994). Uptake and metabolism of toxicants in the respiratory tract. *Environmental Health Perspectives*, 102: 67-70.
- Dahl A.R. (1988). The effect of cytochrome P-450-dependent metabolism and other enzyme activities on olfaction. Dans: *Molecular Neurobiology of the Olfactory System: Molecular, Membranous, and Cytological Studies*, F.L. Margolis et T.V. Getchell (Eds). Plenum Press, New York, p51-70.
- Dahl A.R., Hadley W.M. (1991). Nasal cavity enzymes involved in xenobiotic metabolism: effects on the toxicity of inhalants. *Critical Reviews in Toxicology*, 21: 345-372.
- Dallel R., Villanueva L., Woda A., Voisin D. (2003). Neurobiologie de la douleur trigéminal. *Medecine/Sciences*, 19: 567-574.

- Dawley EM. (1998). Species, sex, and seasonal differences in VNO size. *Microscopy Research and Technique*, 41: 506-518.
- De Ceaurriz J.C., Micillino J.C., Bonnet P., Guenier J.P. (1981). Sensory irritation caused by various industrial airborne chemicals. *Toxicology Letters*, 9: 137-143.
- De Ceaurriz J.C., Desiles J.P., Bonnet P., Marignac B., Muller J., Guenier P. (1983). Concentration-dependent behavioral changes in mice following short-term inhalation exposure to various industrial solvents. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 67: 383-389.
- Del Punta K., Puche A., Adams N.C., Rodriguez I., Mombaerts P. (2002). A divergent pattern of sensory axonal projections is rendered convergent by second-order neurons in accessory olfactory bulb. *Neuron*, 35: 1057-1066.
- Dielenberg R.A., Hunt G.E., McGregor I.S. (2001). "When a rat smells a cat": the distribution of Fos immunoreactivity in rat brain following exposure to predatory odor. *Neuroscience*, 104: 1085-1097.
- Ding X., Dahl A.R. (2003). Olfactory mucosa: composition, enzymatic localization, and metabolism. Dans *Handbook of olfaction et Gustation*, 2e Edition, 1176 pages.
- Dong H.W., Petrovitch G.D., Swanson L.W. (2001). Topography of projections from amygdala to bed nuclei of the stria terminalis. *Brain Research Reviews*, 38: 192-246.
- Dong H.W., Swanson L.W. (2004). Projections from bed nuclei of the stria terminalis, posterior division: implications for cerebral hemisphere regulation of defensive and reproductive behaviors. *Journal of Comparative Neurology*, 471: 396-433.
- Doty R.L., Brugger W.P.E., Jurs P.C., Orndorff M.A., Snyder P.J., Lowry L.D. (1978). Intranasal trigeminal stimulation from odorous volatiles: psychometric responses from anosmic and normal humans. *Physiology and Behavior*, 20: 175-185.
- Døving K.B., Trotier D. (1999). Structure and function of the vomeronasal organ. *Journal of Experimental Biology*, 201: 2913-2925.
- Duchamp-Viret P., Duchamp A., Vigouroux M. (1989). Amplifying role of convergence in olfactory system a comparative study of receptor cell and second-order neuron sensitivities. *Journal of Neurophysiology*, 61: 1085-1094.
- Ducray A., Bondier J-R., Michel G., Bon K., Millot J-L., Propper A., Kastner A. (2002). Recovery following peripheral destruction of olfactory neurons in young and adult mice. *European Journal of Neuroscience*, 15: 1907-1917.
- Dulac C., Axel R. (1995). A novel family of genes encoding putative pheromone receptors in mammals. *Cell*, 83: 195-206.
- Dulac C., Torello A.T. (2003). Molecular detection of pheromone signals in mammals: from genes to behaviour. *Nature Reviews Neuroscience*, 4: 551-562.

Dunnick J.K., Lieuallen W., Moyer C., Orzech D., Nyska A. (2004). Cardiac damage in rodents after exposure to bis(2-chloroethoxy)methane. *Toxicologic Pathology*, 32: 309-317.

Eaton D.L., Bammler T.K. (1999). Concise review of the glutathione S-transferases and their significance to toxicology. *Toxicological Sciences*, 49: 156-164.

Eklblom A., Flock A., Hansson P., Ottoson D. (1984). Ultrastructural and electrophysiological changes in the olfactory epithelium following exposure to organic solvents. *Acta Otolaryngologica*, 98: 351-361.

Emmanouil D.E., Johnson C.H., Quock R.M. (1994). Nitrous oxide anxiolytic effect in mice in the elevated plus maze: mediation by benzodiazepine receptors. *Psychopharmacology*, 115: 167-172.

Farbman A.I. (1992). Development and plasticity. In *Cell Biology of Olfaction*, Barlow P.W., Bray D., Green P.B., Slack J.M.W. (Eds). Cambridge University Press, Cambridge, pp 167-206.

Ferris K.E., Clark R.D., Coates E.L. (2007). Topical inhibition of nasal carbonic anhydrase affects the CO<sub>2</sub> detection threshold in rats. *Chemical Senses*, 32: 263-271.

Firestein S., Darrow B., Shepherd G.M. (1991). Activation of the sensory current in salamander olfactory receptor neurons depends on a G protein-mediated cAMP second messenger system. *Neuron*, 6: 825-835.

Gaafar H., Tantawy A., Hamza M., Shaaban M. (1998). The effect of ammonia on olfactory epithelium and vomeronasal organ neuroepithelium of rabbits. A histological and histochemical study. *Journal for oto-rhino-laryngology and its related specialties*, 60: 88-91.

Gaskell B.A. (1990). Nonneoplastic changes in the olfactory epithelium - experimental studies. *Environmental Health Perspectives*, 85: 275-259.

Genter M.B., Liang H.C., Gu J., Ding X., Negishi M., McKinnon R.A., Nebert D.W. (1998). Role of CYP2A5 and 2G1 in acetaminophen metabolism and toxicity in the olfactory mucosa of the Cyp1a2(-/-) mouse. *Biochemical Pharmacology*, 55: 1819-1826.

Giacobini P., Benetto A., Tirindelli R., Fasolo A. (2000). Proliferation and migration of receptors neurons in the vomeronasal organ of the adult mouse. *Developmental Brain Research*, 123: 33-40.

Giddens W.E., Fairchild G.A. (1972). Effects of sulfur dioxide on the nasal mucosa of mice. *Archives of Environmental Health*, 25: 166-173.

Gold G.H., Nakamura T. (1987). Cyclic nucleotide-gated conductances: a new class of ionic channels mediates visual and olfactory transduction. *Trends in Pharmacology*, 8: 312-316.

- Gordon M.K., Mumm J.S., Davis R.A., Holcomb J.D., Calof A.L. (1995). Dynamics of MASH1 expression in vitro and in vivo suggest a non-stem cell site of MASH1 action in the olfactory receptor neuron lineage. *Molecular and Cellular Neurosciences*, 6: 363-379.
- Green B.G., Lawless H.T. (1991). The psychophysics of somatosensory chemoreception in the nose and mouth. In: Getchell T.V., Doty R.L., Bartoshuk L.M., and Snow J.B. (eds), *Smell and Taste in Health and Disease*, Raven Press, New York, pp235-253.
- Green N., Weech M., Walters E. (2005). Localization and characterization of glutathione-s-transferase isozymes alpha, mu, and pi within the mouse vomeronasal organ. *Neuroscience Letters*, 375: 198-202.
- Gu J., Walker V.E., Lipinskas T.W., Walker D.M., Ding X. (1997). Intraperitoneal administration of coumarin causes tissue-selective depletion of cytochromes P450 and cytotoxicity in the olfactory mucosa. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 146: 134-143.
- Gu J., Dudley C., Su T. Spink D.C., Zhang Q.Y., Moss R.L., Ding X. (1999). Cytochrome P450 and steroid hydroxylase activity in mouse olfactory and vomeronasal mucosa. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 266: 262-267.
- Hajjar E., Perahia D., Debat H., Nespoulous C., Rober C.H. (2006). Odorant binding and conformational dynamics in the odorant-binding protein. *Journal of Biological Chemistry*, 281: 29929-29937.
- Halpern M., Martinez-Marcos A. (2003). Structure and function of the vomeronasal system: an update. *Progress in Neurobiology*, 70:245-318.
- Hansel D.E., Eipper B.A., Ronnett G.V. (2001). Neuropeptide Y functions as a neuroproliferative factors. *Nature*, 410 : 940-944.
- Harkema J.R., Plopper C.G., Hyde D.M., St George J.A., Dungworth D.L.(1987a). Effects of an ambient level of ozone on primate nasal epithelial mucosubstances. Quantitative histochemistry. *American Journal of Pathology*, 127: 90-96.
- Harkema J.R., Plopper C.G., Hyde D.M., St George J.A., Wilson D.W., Dungworth D.L. (1987b). Response of the macaque nasal epithelium to ambient levels of ozone. A morphologic and morphometric study of the transitional and respiratory epithelium. *American Journal of Pathology*, 128: 29-44.
- Hart S.G.E., Cartun R.W., Wyand D.S., Khairallah E.A., Cohen S.D. (1995). Immunohistochemical localization of acetaminophen in target tissues of the CD-1 mouse: correspondence of covalent binding with toxicity. *Fundamental and Applied Toxicology*, 24: 260-274.
- Hastings L. (1990). Sensory neurotoxicology: use of the olfactory system in the assessment of toxicity. *Neurotoxicology and Teratology*, 12: 455-459.
- Hastings L., Evans J.E. (1991). Olfactory primary neurons as a route of entry for toxic agents into the CNS. *Neurotoxicology*, 12: 707-714.

Hastings L., Miller M.L. (2003). Influence of environmental toxicants on olfactory function. Dans Doty, R.L. (ed.), *Handbook of Olfaction and Gustation*, 2nd edn. Marcel Dekker, Philadelphia, PA, pp. 575–591.

Hayashi H., Kunugita N., Arashidani K., Fujimaki H., Ichikawa M. (2003). Long-term exposure to low levels of formaldehyde increases the number of tyrosine hydroxylase-immunopositive periglomerular cells in mouse main olfactory bulb. *Brain Research*, 1007: 192-197.

Herrada G., Dulac C. (1997). A novel family of putative pheromone receptors in mammals with a topographically organized and sexually dimorphic distribution. *Cell*, 90: 763-773.

Hormes J., Filley C., Rosenberg N. (1986). Neurologic sequelae of chronic solvent vapor abuse. *Neurology*, 36: 698-702.

Hotchkiss J.A., Kim S.G., Novak R.F., Dahl A.R. (1993). Enhanced hepatic expression of P450IIE1 following inhalation exposure to pyridine. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 118: 98-104.

Hu J., Zhong C., Ding C., Chi Q., Walz A., Mombaerts P., Mastunami H., Luo M. (2007). Detection of near-atmospheric concentrations of CO<sub>2</sub> by an olfactory subsystem in the mouse. *Science*, 317: 953-957.

Hua Z., Zhang Q.Y., Su T., Lipinkas T.W., Ding X. (1997). cDNA cloning, heterologous expression, and characterization of mouse CYP2G1, an olfactory-specific steroid hydroxylase. *Archive of Biochemistry and Biophysics*, 340: 208-214.

Hummel T. (2000). Assessment of intranasal trigeminal function. *International Journal of Psychophysiology*, 36: 147-155.

Ichinose T., Sagai M. (1992). Combined exposure to NO<sub>2</sub>, O<sub>3</sub> and H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-aerosol and lung tumor formation in rats. *Toxicology*, 74: 173-184.

Institut National de Recherche et de Sécurité (INRS). Fiche Toxicologique n°85, Pyridine. Edition 2001.

Institut National de Recherche et de Sécurité (INRS). Fiche Toxicologique n°3, Acétone. Edition 2003.

Institut National de Recherche et de Sécurité (INRS). Fiche Toxicologique n°74, Toluène. Edition 2004.

Institut National de Recherche et de Sécurité (INRS). Hygiène et sécurité du travail. Cahier de notes documentaires/ Panorama de l'utilisation des solvants en France fin 2004. 2<sup>e</sup> trimestre 2005a, 199: 65-97.

Institut National de Recherche et de Sécurité (INRS). Fiche Toxicologique n°238, Dioxyde de Carbone. Edition 2005b.

- Irwin R.D., Chou B.J., Mellick P.W., Miller R.A., Mahler J., Roycroft J. (1997). Toxicity of furfuryl alcohol to F344 rats and B6C3F1 mice exposed by inhalation. *Journal of Applied Toxicology*, 17: 159-169.
- Jacobson L. (1813). Anatomisk Beskrivelse over et nyt Organ i Huusdyrenes Naese. *Veterinoer = Selskapets Skifter (en danois)*, 2: 209-246.
- Jacobson L., Trotier D., Døving K.B. (1998). Anatomical description of a new organ in the nose domesticated animal. *Chemical Senses*, 23: 743-754.
- Jacquot L., Monnin J., Brand G. (2004). Influence of nasal trigeminal stimuli on olfactory sensitivity. *Comptes Rendus Biologies*, 327: 305-311.
- Jacquot L., Pourie G., Buron G., Monnin J., Brand G. (2006). Effects of toluene inhalation exposure on olfactory functioning: behavioral and histological assessment. *Toxicology Letters*, 165: 57-65.
- Jia C., Halpern M. (1996). Subclasses of vomeronasal receptor neurons: differential expression of G proteins ( $G_{i\alpha 2}$  and  $G_{o\alpha}$ ) and segregated projections to the accessory olfactory bulb. *Brain Research*, 719:117-128.
- Johansson S.L. (1981). Carcinogenicity of analgesics: long-term treatment of Sprague-Dawley rats with phenacetin, phenazone, caffeine, and paracetamol (acetaminophen). *International Journal of Cancer*, 27: 521-259.
- Johnson B.A., Leon M. (2000). Modular representations of odorants in the glomerular layer of the rat olfactory bulb and the effects of stimulus concentration. *Journal of Comparative Neurology*, 422: 496-509.
- Johnson N.F., Hotchkiss J.A., Harkema J.R., Henderson R.F. (1990). Proliferative responses of rat nasal epithelia to ozone. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 103: 143-155.
- Jones D.T., Reed R.R. (1989). Golf: an olfactory neuron, specific-G protein involved in odorant signal transduction. *Science*: 244: 790-795.
- Newton PE, Bolte HF, Derelanko MJ, Hardisty JF, Rinehart WE. (2000). Chronic inhalation toxicity and carcinogenicity studies of 3-chloro-2-methylpropene in BDF1 mice. *Industrial Health*, 38: 309-318.
- Keeling C.D., Whorf T.P., Wahlen M., Van der Plicht J. (1995). Interannual extremes in the rate of rise of atmospheric carbon dioxide since 1980. *Nature*, 375: 666-670.
- Keller M., Douhard Q., Baum M.J., Bakker J. (2006). Destruction of the main olfactory epithelium reduces female sexual behavior and olfactory investigation in female mice. *Chemical Senses*, 31: 315-323.
- Kelliher K.R. (2007). The combined role of the main olfactory and vomeronasal systems in social communication in mammals. *Hormones and Behavior*, 52: 561-570.

Kerns W.D., Pavkov K.L., Donofrio D.J., Gralla E.J., Swenberg J.A. (1983). Carcinogenicity of formaldehyde in rats and mice after long-term inhalation exposure. *Cancer Research*, 43: 4382-4392.

Kim H., Asgari F., Kato-Negishi M., Ohkura S., Okamura H., Arakawa H., Osada T., Ikai A. (2007). Distribution of olfactory marker protein on a tissue section of vomeronasal organ measured by AFM. *Colloids and Surfaces*, 61: 311-314.

Kimoto H., Saga S., Sato K., Touhara K. (2005). Sex-specific peptides from exocrine glands stimulate mouse vomeronasal sensory neurons. *Nature*, 437: 898-901.

Kjellstrand P., Holmquist B., Jonsson I., Romare S., Månsson L. (1985). Effects of organic solvents on motor activity in mice. *Toxicology*, 35: 35-46.

Kleene S.J., Gesteland R.C. (1981). Dissociation of frog olfactory epithelium with N-ethylmaleimide. *Brain Research*, 229: 536-540.

Ko H.J., Park T.H. (2006). Dual signal transduction mediated by a single type of olfactory receptor expressed in a heterologous system. *Biological Chemistry*, 387: 59-68.

Korbo L., Ladefoged O., Lam H.R., Ostergaard G., West M.J., Arlien-Soborg P. (1996). Neuronal loss in hippocampus in rats exposed to toluene. *Neurotoxicology*, 17: 359-366.

Kristensen I.A., Olsen J. (2006). Determinants of acute respiratory infections in Soweto-a population-based birth cohort. *South African Medical Journal*, 96: 633-640.

Kristesashvili T.S. (1965). Data to substantiate the maximal permissible concentration of pyridine in the atmosphere. *Gigiena i Sanitariia*, 30: 173-177.

Krohn T.C., Hansen A.K. (2000). The effects of and tolerances for carbon dioxide in relation to recent developments in laboratory animal housing. *Scandinavian Journal of Laboratory Animal Science*, 27: 173-181.

Larson J.L., Wolf D.C., Morgan K.T., Méry S., Butterworth B.E. (1994). The toxicity of 1-week exposures to inhaled chloroform in female B6C3F1 mice and male F-344 rats. *Fundamental and Applied Toxicology*, 22: 431-446.

Leinders-Zufall T., Brennan P., Widmayer P. (2004). MHC class I peptides as chemosensory signals in the vomeronasal organ. *Science*, 306: 1033-1037.

Leinders-Zufall T., Lane A.P., Puche A.C., Weidong M., Novotny M.V, Shipley M.T., Zufall F. (2000). Ultrasensitive pheromone detection by mammalian vomeronasal neurons. *Nature*, 405: 792-796.

Lewis J.L., Rhoades C.E., Gervasi P.G., Griffith W.C., Dahl A.R. (1991). The cyanide-metabolizing enzyme rhodanese in human nasal respiratory mucosa. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 108: 114-120.

Leybold B.G., Yu C.R., Leinders-Zufall T., Kim M.M., Zufall F., Axel R. (2002). Altered sexual and social behaviors in *trp2* mutant mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 99: 6376-6381.

- Li C., Kaba H., Saito H., Seto K. (1990). Neural mechanisms underlying the action of primer pheromones in mice. *Neuroscience*, 36: 773-778.
- Liam E.R., Corey D.P. (1996). Electrophysiological characterization of chemosensory neurons from the mouse vomeronasal organ. *Journal of Neurology*, 16: 4625-4637.
- Liberles S.D., Buck L.B. (2006). A second class of chemosensory receptors in the olfactory epithelium. *Nature*, 442: 645-650.
- Lin D.Y., Zhang S.Z., Block E., Katz L.C. (2005). Encoding social signals in the mouse main olfactory bulb. *Nature*, 434: 470-477.
- Loconto J., Papes F., Chang E., Stowers L., Jones E.P., Takada T., Kumánovics A., Fischer Lindahl K., Dulac C. (2003). Functional expression of murine V2R pheromone receptors involves selective association with the M10 and M1 families of MHC class Ib molecules. *Cell*, 112: 607-618.
- Lucas P., Ulkhanov K., Leinders-Zufall T., Zufall F. (2003). Diacylglycerol-gated cation channel in vomeronasal neuron dendrites is impaired in TRPC2 mutant mice: mechanism of pheromone transduction. *Neuron*, 40: 551-561.
- Ma M. (2007). Encoding olfactory signals via multiple chemosensory systems. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 42: 463-480.
- McGregor I.S., Hargreaves G.A., Apfelbach R., Hunt G.E. (2004). Neural correlates of cat odor-induced anxiety in rats: region-specific effects of the benzodiazepine midazolam. *Journal of Neuroscience*, 24: 4134-4144.
- Mackenzie P.I., Owens I.S., Burchell B., Bock K.W., Bairoch A., Bélanger A., Fournel-Gigleux S., Green M., Hum D.W., Iyanagi T., Lancet D., Louisot P., Magdalou J., Chowdhury J.R., Ritter J.K., Schachter H., Tephly T.R., Tipton K.F., Nebert D.W. (1997). The UDP glycosyltransferase gene superfamily: recommended nomenclature update based on evolutionary divergence. *Pharmacogenetics*, 7: 255-269.
- Malnic B., Hirono J., Sato T., Buck L.B. (1999). Combinatorial receptor codes for odors. *Cell*, 96: 713-723.
- Marchlewska-Koj A. (1981). Pregnancy block elicited by male urinary peptides in mice. *Journal of Reproduction and Fertility*, 61: 221-224.
- Martínez-Ricós J., Agustín-Pavón C., Lanuza E., Martínez-García F. (2008). Role of the vomeronasal system in intersexual attraction in female mice. *Neuroscience*, 153: 383-395.
- Matsui M., Homma H. (1994). Biochemistry and molecular biology of drug-metabolizing sulfotransferase. *International Journal of Biochemistry*, 26: 1237-1247.
- Matsunami H., Buck L.B. (1997). A multigene family encoding a diverse array of putative pheromone receptors in mammals. *Cell*, 90: 775-784.

- Matsuoka M., Yoshida-Matsuoka J., Costanzo RM., Ichikawa M. (2000). Surface changes in the rat vomeronasal epithelium during degeneration and regeneration of sensory receptor cells. *Anatomy and Embryology*, 201: 467-473.
- Matulionis D.H. (1975). Ultrastructural study of mouse olfactory epithelium following destruction by ZnSO<sub>4</sub> and its subsequent regeneration. *American Journal of Anatomy*, 142: 67-89.
- McBride K., Slotnick B., Margolis F.L. (2003). Does intranasal application of zinc sulfate produce anosmia in the mouse? An olfactometric and anatomical study. *Chemical Senses*, 28 : 659-670.
- McGregor I.S., Hargreaves G.A., Apfelbach R., Hunt G.E. (2004). Neural correlates of cat odor-induced anxiety in rats: region-specific effects of the benzodiazepine midazolam. *Journal of Neuroscience*, 24: 4134-4144.
- Medinsky M.A., Bond J.A. (2001). Sites and mechanisms for uptake of gases and vapors in the respiratory tract. *Toxicology*, 160: 165-172.
- Meredith M. (1994). Chronic recording of vomeronasal pump activation in awake behaving hamsters. *Physiology and Behavior*, 56: 345-354.
- Meredith M., O'Connell R.J. (1979). Efferent control of stimulus access to the hamster vomeronasal organ. *Journal of Physiology*, 286: 301-316.
- Mery S., Larson J.L., Butterworth B.E., Wolf D.C., Harden R., Morgan K.T. (1994). Nasal toxicity of chloroform in male F-344 rats and female B6C3F1 mice following a 1-week inhalation exposure. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 125: 214-227.
- Miller M.L., Andringa A., Evans J.E., Hastings L. (1995). Microvillar cells of the olfactory epithelium: morphology and regeneration following exposure to toxic compounds. *Brain Research*, 669: 1-9.
- Miller R.R., Ayres J.A., Jersey G.C., McKenna M.J. (1981). Inhalation toxicity of acrylic acid. *Fundamental and Applied Toxicology*, 1: 271-277.
- Min Y.G., Rhee C.S., Choo M.J., Song H.K., Hong S.C. (1994). Histopathologic changes in the olfactory epithelium in mice after exposure to sulfur dioxide. *Acta Otolaryngologica*, 114: 447-452.
- Minn A., Leclerc S., Heydel J.M., Minn A.L., Denizcot C., Cattarelli M., Netter P., Gradinaru D. (2002). Drug transport into the mammalian brain: the nasal pathway and its specific metabolic barrier. *Journal of Drug Targeting*, 10: 285-296.
- Miyawaki A., Matsushita F., Ryo Y., Mikoshiba K. (1994). Possible pheromone-carrier function of two lipocalin proteins in the vomeronasal organ. *European Molecular Biology Organization Journal*, 13:5835-5842.
- Miyawaki A., Homma H., Tamura H., Matsui M., Mikoshiba K. (1996). Zonal distribution of sulfotransferase for phenol in olfactory sustentacular cells. *The European Molecular Biology Organization Journal*, 15: 2050-2055.

- Mombaerts P. (1999). Molecular biology of odorant receptors in vertebrates. *Annual Review of Neuroscience*, 22: 487-509.
- Mombaerts P. (2004). Genes and ligands for odorant, vomeronasal and taste receptors. *Nature Reviews Neuroscience*, 5: 263-278.
- Monahan E., Yamazaki K., Beauchamp G.K., Maxson S.C. (1993). Olfactory discrimination of urinary odortypes from congenic strains (DBA/1Bg and DBA1.C57BL10-YBg) of mice differing in their Y chromosomes. *Behavior Genetics*, 23: 251-255.
- Monticello T.M., Miller F.J., Morgan K.T. (1991). Regional increases in rat nasal epithelial cell proliferation following acute and subchronic inhalation of formaldehyde. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 111: 409-421.
- Morgan K.T. (1991). Approaches to the identification and recording of nasal lesions in toxicology studies. *Toxicologic Pathology*, 19: 337-351.
- Morgan D.L., Mahler J.F., Dill J.A., Price H.C. Jr, O'Connor R.W., Adkins B. Jr. (1993). Styrene inhalation toxicity studies in mice. II. Sex differences in susceptibility of B6C3F1 mice. *Fundamental and Applied Toxicology*, 21: 317-325.
- Morgan K.T. (1997). A brief review of formaldehyde carcinogenesis in relation to rat nasal pathology and human health risk assessment. *Toxicologic Pathology*, 25: 291-307.
- Mori K., Nagao H., Yoshihara Y. (1999). The olfactory bulb: coding and processing of odor molecule information. *Science*, 286: 711-715.
- Morrison E.E., Costanzo R.M. (1990). Morphology of the human olfactory epithelium. *Journal of Comparative Neurology*, 297: 1-13.
- Nagano K., Katagiri T., Aiso S., Senoh H., Sakura Y., Takeuchi T. (1997). Spontaneous lesions of nasal cavity in aging F344 rats and BDF1 mice. *Experimental and Toxicologic Pathology*, 49: 97-104.
- National Toxicology Program. (1994). NTP Toxicology and Carcinogenesis Studies of Ozone (CAS No. 10028-15-6) and Ozone/NNK (CAS No. 10028-15-6/ 64091-91-4) in F344/N Rats and B6C3F1 Mice (Inhalation Studies). National Toxicology Program Technical Report Series, 440: 1-314.
- Nef P., Heldman J., Lazard D., Margalit T., Jaye M., Hanukoglu I., Lancet D. (1989). Olfactory-specific cytochrome P-450. cDNA cloning of a novel neuroepithelial enzyme possibly involved in chemoreception. *Journal of Biological Chemistry*, 264: 6780-6785.
- Newman S.W. (1999). The medial extended amygdala in male reproductive behavior. A node in the mammalian social behavior network. *Annals of the New York Academy of Science*, 877: 242-257.
- Newman M.P., Féron F., Mackay-Sim A. (2000). Growth factor regulation of neurogenesis in adult olfactory epithelium. *Neuroscience*, 99: 343-350.

Newton P.E., Bolte H.F., Derelanko M.J., Hardisty J.F., Rinehart W.E. (2002). An evaluation of changes and recovery in the olfactory epithelium in mice after inhalation exposure to methylethylketoxime. *Inhalation Toxicology*, 14: 1249-1260.

Nikula K.J., Lewis J.L. (1994). Olfactory mucosal lesions in F344 rats following inhalation exposure to pyridine at threshold limit valu concentrations. *Fundamental and Applied Toxicology*, 23: 510-517.

Nishimura K., Utsumi K., Yuhara M., Fujitani Y., Iritani A. (1989). Identification of puberty-accelerating pheromones in male mouse urine. *Journal of Experimental Zoology*, 251: 300-305.

Okamoto K. (1981). Inactivating effects of UV rays and ozone on cockroach aggregation pheromones of 4 species. *Japanese Journal of Sanitary Zoology*, 32: 29-36.

Pacini S., Giovannelli L., Gulisano M., Peruzzi B., Polli G., Boddi V., Ruggiero M., Bozzo C., Stomeo F., Fenu G., Pezzatini S., Pitozzi V., Dolara P. (2003). Association between atmospheric ozone levels and damage to human nasal mucosa in Florence, Italy. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 42: 127-135.

Pelosi O. (1994). Odorant-binding proteins. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 29: 199-228.

Perov O.V. (1973). Effect of inhalation of subchronic doses of pyridine on the state of surfactant in the lung alveoli and on lipid formation of the pneumocytes. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 76: 766-769.

Persson E., Henriksson J., Tjälve H. (2003). Uptake of cobalt from the nasal mucosa into the brain via olfactory pathways in rats. *Toxicology Letters*, 145: 19-27.

Piras E., Franzén A., Fernández E.L., Bergström U., Raffalli-Mathieu F., Lang M., Brittebo E.B. (2003). Cell-specific expression of CYP2A5 in the mouse respiratory tract: effects of olfactory toxicants. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 51: 1545-1555.

Pires-Neto C.R., Lichtenfels J.A., Soares R.S., Macchione M., Nascimento Saldiva P.H., Dolhnikoff M. (2006). Effects of São Paulo air pollution on the upper airways of mice. *Environmental Research*, 101: 356-361.

Pixley S.K., Farbman A.I., Menco B.P. (1997). Monoclonal antibody marker for olfactory sustentacular cell microvilli. *Anatomical Record*, 248: 307-321.

Pozzani U.C., Carpenter C.P., Palm P.E., Weil C.S., Nair J.H. (1959). An investigation of the mammalian toxicity of acetonitrile. *Journal of Occupational Medicine*, 1: 634-642.

Preutthipan A., Udomsubpayakul U., Chaisupamongkollarp T., Pentamwa P. (2004). Effect of PM10 pollution in Bangkok on children with and without asthma. *Pediatric Pulmonology*, 37: 187-192.

- Price S. (1984). Mechanisms of stimulation of olfactory neurons: an essay. *Chemical Senses*, 8: 341-354.
- Price S. (1986). Effects of odorant mixtures on olfactory receptor cells. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 512: 55-60.
- Raming K., Krieger J., Strotmann J., Kubick S., Boekhoff I., Baumstark C., Breer H. (1993). Cloning and expression of odorant receptors. *Nature*, 361: 353-356.
- Reed C.J., Gaskell B.A., Banger K.K., Lock E.A. (1995). Olfactory toxicity of methyl iodide in the rat. *Archives of Toxicology*, 70: 51-56.
- Renaud R. (2006). Mémoire de Master recherche Neurosciences et Comportement. Effet de l'acétate de n-butyle sur la chemoréception nasale.
- Ressler J.K., Sullivan S.L., Buck L.B. (1993). A zonal organization of odorant receptor gene expression in the olfactory epithelium. *Cell*, 73: 597-609.
- Restrepo D., Arellano J., Oliva A.M., Schaefer M.L., Lin W. (2004). Emerging views on the distinct but related roles of the main and accessory olfactory systems in responsiveness to chemosensory signals in mice. *Hormones and Behavior*, 46: 247-256.
- Robinson D.A., Foster J.R., Nash J.A., Reed C.J. (2003). Development of methodology for the three-dimensional modelling of the metabolic capacity of the rat nasal cavity using glutathione S-transferase M1 as an example. *Toxicologic Pathology*, 31: 332-339.
- Rodriguez I. (2004). Pheromone receptors in mammals. *Hormones and Behavior*, 46: 219-230.
- Rodriguez I., Del Punta K., Rothman A., Ishii T., Mombaerts P. (2002). Multiple new and isolated families within the mouse superfamily of V1r vomeronasal receptors. *Nature Neuroscience*, 5: 134-140.
- Ryba N.J.P., Tirindelli R. (1997). A new multigene family of putative pheromone receptors. *Neuron*, 19: 371-379.
- Saucier D., Astic L. (1986). Analysis of the topographical organization of olfactory epithelium projections in the rat. *Brain Reserch Bulletin*, 16: 455-462.
- Savic I. (2001). Processing of odorous signals in humans. *Brain research Bulletin*, 54: 307-312.
- Savic I., Gulyas B., Larsson M., Roland P. (2000). Olfactory functions are mediated by parallel and hierarchical processing. *Neuron*, 26: 735-745.
- Scott J.W., Brierley T., Schmidt F.H. (2000). Chemical determinants of the rat electro-olfactogram. *Journal of Neuroscience*, 20: 4721-4731.
- Sekizawa S.I., Tsubone H. (1994). Nasal receptors responding to noxious chemicals irritants. *Respiration Physiology*, 96: 37-48.

- Shiraiwa T., Kamiyama N., Kashiwayanagi M. (2007). Decreases in urinary pheromonal activities in male mice after exposure to 3-methylchoranthrene. *Toxicology Letters*, 8: 137-144.
- Schoenfeld T.A., Clancy A.N., Forbes W.B., Macrides F. (1994). The spatial organization of the peripheral olfactory system of the hamster. Part I: receptor neuron projections to the main olfactory bulb. *Brain Research Bulletin*, 34: 183-210.
- Sipos M.L., Wysocki C.J., Nyby J.G., Wysocki L., Nemura T.A. (1994). An ephemeral pheromone of female house mice: perception via the main and accessory olfactory systems. *Physiology and Behavior*, 58: 529-534.
- Signore P., Chaoui M., Nosten-Bertrand M., Perez-Diaz F., Marchaland C. (1991). Handedness in mice: comparison across eleven inbred strains. *Behavior Genetics*, 21: 421-429.
- Spehr M., Spehr J., Ukhanov K., Kelliher K.R., Leinders-Zufall T., Zufall F. (2006). Parallel processing of social signals by the mammalian main and accessory olfactory systems. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 63: 1476-1484.
- Steinbrecht R.A. (1996). Are odorant-binding-proteins involved in odorant discrimination? *Chemical Senses*, 21: 719-727.
- Strotmann J., Conzelmann S., Beck A., Feinstein P., Breer H., Mombaerts P. (2000). Local permutations in the glomerular array of the mouse olfactory bulb. *Journal of Neuroscience*, 20: 6927-6938.
- Su T., Sheng J.J., Lipinkas T.W., Ding X. (1996). Expression of CYP2A genes in rodent and human nasal mucosa. *Drug Metabolism and Disposition*, 24: 884-890.
- Sun J.D., Dahl A.R., Gillett N.A., Barr E.B., Crews M.L., Eidson A.F., Bechtold W.E., Burt D.G., Dieter M.P., Hobbs C.H. (1991). Two-week, repeated inhalation exposure of F344/N rats and B6C3F1 mice to ferrocene. *Fundamental and Applied Pharmacology*, 17: 150-158.
- Swanson L.W. (2000). Cerebral hemisphere regulation of motivated behavior. *Brain Research*, 886: 113-164.
- Takeuchi H., Imanaka Y., Hirono J., Kurahashi T. (2003). Cross-adaptation between olfactory responses induced by two subgroups of odorant molecules. *Journal of General Physiology*, 122: 255-264.
- Tephly T.R. (1990). Isolation and purification of UDP-glucuronosyltransferases. *Chemical Research in Toxicology*, 3: 519-516.
- Tirindelli R., Mucignat-Caretta C., Ryba N.J. (1998). Molecular aspects of pheromonal communication via the vomeronasal organ of mammals. *Trends in Neurosciences*, 21: 482-486.
- Tsuboi A., Yoshihara S., Yamazaki N., Kasai H., Asai-Tsuboi H., Komatsa M., Serizawa S., Ishii T., Matsuda Y., Nagawa F., Sakano H. (1999). Olfactory neurons expressing

closely linked and homologous odorant receptor genes tend to project their axons to neighboring glomeruli on the olfactory bulb. *Journal of Neuroscience*, 19: 8409-8418.

Uchida N., Takahashi Y.K., Tanifuji M., Mori K. (2000). Odor maps in the mammalian olfactory bulb: domain organization and odorant structural features. *Nature Neuroscience*, 3: 1035-1043.

Uraih L.C., Talley F.A., Mitsumori K., Gupta B.N., Bucher J.R., Boorman G.A. (1987). Ultrastructural changes in the nasal mucosa of Fischer 344 rats and B6C3F1 mice following an acute exposure to methyl isocyanate. *Environmental Health Perspectives*, 72: 77-88.

Vanderbergh J.G., Whitsett J.M., Lombardi J.R. (1975). Partial isolation of a pheromone accelerating puberty in female mice. *Journal of Reproduction and Fertility*, 43: 515-523.

Vassar R., Ngai J., Axel R. (1993). Spatial segregation of odorant receptor expression in the mammalian olfactory epithelium. *Cell*, 74: 309-318.

Vent J, Robinson AM, Gentry-Nielsen MJ, Conley DB, Hallworth R, Leopold DA, Kern RC. (2004). Pathology of the olfactory epithelium: smoking and ethanol exposure. *Laryngoscope*, 114: 1383-1388.

Von Mihalkovics V. (1899). Nasenhöhle und Jacosonsches Organ. *Anatomy and Embryology*, 11: 1-108.

Wegmann M., Renz H., Herz U. (2002). Long-term NO<sub>2</sub> exposure induces pulmonary inflammation and progressive development of airflow obstruction in C57BL/6 mice: a mouse model for chronic obstructive pulmonary disease? *Pathobiology*, 70: 284-286.

Weseka K.S., Anholt R.R.H. (1997). Pheromone regulated production of inositol-(1,4,5)-triphosphate in the mammalian vomeronasal organ. *Endocrinology*, 138: 3497-3504.

Whitby-Logan G.K., Weech M., Walters E. (2004). Zonal expression and activity of glutathione S-transferase enzymes in the mouse olfactory mucosa. *Brain Research*, 995: 151-157.

Widdicombe J.G., Sant'Ambrogio G., Mathew O.P. (1988). Nerve receptors of the upper airway. In: Mathew O.P. and Sant'Ambrogio G. (eds), *Respiratory Function of the Upper Airway*. Marcel Dekker, New York, pp 193-231.

Wilson K., Raisman G. (1980). Age-related changes in the neurosensory epithelium of the mouse vomeronasal organ: extended period of postnatal growth in size and evidence for rapid cell turnover in the adult. *Brain Research*, 185: 103-113.

Win-Shwe T., Mitsushima D., Nakajima D., Ahmed S., Yamamoto S., Tsukahar S., Kakeyam M., Goto S., Fujimaki H. (2007). Toluene induces rapid and reversible rise of hippocampal glutamate and taurine neurotransmitter levels in mice. *Toxicology Letters*, 168: 75-82.

- Wong S.T., Trinh K., Hacker B., Chan G.C., Lowe G., Gaggar A., Xia Z., Gold G.H., Storm D.R. (2000). Disruption of the type III adenylyl cyclase gene leads to peripheral and behavioral anosmia in transgenic mice. *Neuron*, 3: 487-97.
- Wysocki C.J., Yamazaki K., Curran M., Wysocki L.M., Beauchamp G.K. (2004). Mice (*Mus musculus*) lacking a vomeronasal organ can discriminate MHC-determined odortypes. *Hormones and Behavior*, 46: 241-246.
- Xu F., Schaefer M., Kida I., Schafer J., Liu N., Rothman D.L., Hyder F., Restrepo D., Shepherd G.M. (2005). Simultaneous activation of mouse main and accessory olfactory bulbs by odors or pheromones. *Journal of Comparative Neurology*, 489: 491-500.
- Yang G.C., Scherer P.W., Zhao K., Mozell M.M. (2007). Numerical modeling of odorant uptake in the rat nasal cavity. *Chemical Senses*, 32: 273-284.
- Yang H., Shi P., Zhang Y.P., Zhang J. (2005). Composition and evolution of the V2r vomeronasal receptor gene repertoire in mice and rats. *Genomics*, 86: 306-315.
- Yoshida-Matsuoka J., Matsuoka M., Costanzo R.M., Ichikawa M. (2000). Morphological and histological changes in the regenerating vomeronasal epithelium. *Journal of Veterinary Medical Science*, 62: 1253-1261.
- Youngentob S., Hornung D., Mozell M. (1990). Determination of carbon dioxide detection thresholds in trained rats. *Physiology and Behavior*, 49: 21-26.
- Youngentob S., Hornung D., Mozell M. (1991). Determination of carbon dioxide in detection thresholds in trained rats. *Physiology and Behavior*, 49: 21-26.
- Zald D.H., Pardo J.V. (2000). Functional neuroimaging of the olfactory system in humans. *International Journal of Psychophysiology*, 36: 165-181.
- Zhang X., Firestein S. (2002). The olfactory receptor gene superfamily of the mouse. *Nature Neuroscience*, 5: 124-133.
- Zhuo X., Gu J., Zhang Q.Y., Spink D.C., Kaminsky L.S., Ding X. (1999). Biotransformation of coumarin by rodent and human cytochromes P-450: metabolic basis of tissue-selective toxicity in olfactory mucosa of rats and mice. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 288: 463-471.
- Zufall F. (2005). The TRPC2 ion channel and pheromone sensing in the accessory olfactory system. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 371: 245-250.
- Zufall F., Ukhanov K., Lucas P., Liman E.R., Leinders-Zufall T. (2005). Neurobiology of TRPC2: from gene to behavior. *Pflügers Archiv: European Journal of Neuroscience*, 451: 61-71.

## ANNEXE

## **ANNEXE 1**

# Effects of toluene inhalation exposure on olfactory functioning: Behavioral and histological assessment

L. Jacquot, G. Pourie, G. Buron, J. Monnin, G. Brand\*

*Laboratoire de Neurosciences, Université de Franche-Comté–Place Leclerc, 25000 Besançon, France*

Received 15 September 2005; received in revised form 24 January 2006; accepted 24 January 2006

Available online 29 March 2006

## Abstract

Exposure to pollutant or toxic substances is known to induce adverse health effects but few studies have been devoted to study the impact on olfactory functioning although neuroreceptors in the nasal cavity are directly in contact with volatile molecules. Thus, this work was designed to evaluate in mice the potential modifications of the olfactory functioning during (1 month) and after (1 month) a prolonged toluene exposure at both sensitive/perceptive and cellular levels. Mice were exposed to 1000 ppm of toluene for 5 h/day, 5 days/week for 4 weeks. Firstly, behavioral evaluation (T-maze test) to toluene sensitivity showed a constant decrease during all the 4 weeks of exposure (W1–W4) which continued during 2 weeks after the exposure (W5, W6). In contrast, during the last 2 weeks of the experiment (W7, W8), the sensitivity of mice to toluene went back to normal. Secondly, structural modifications, i.e. density of cells and thickness of olfactory epithelium were observed soon after the outset of exposure. The number of cells did not change at the beginning of exposure (W1, W2), decreased markedly later (W3, W4), increased significantly the first week of the recovery period (W5) and stayed stable during the following weeks (W6–W8). Concerning the thickness of neuroepithelium, the results at W1 showed a decrease followed by an increase suggesting an inflammatory process (W2, W3). In contrast, the results of W4 revealed an abrupt decrease of the thickness whereas the return to normal arose immediately at the outset of recovery period. © 2006 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

**Keywords:** Olfaction; Sensitivity; Behavior; Olfactory epithelium; Toluene; Histology

## 1. Introduction

Airborne chemicals and volatile molecules enter the nose and can interact with chemoreceptors in the nasal cavity, especially trigeminal and olfactory receptors. Exposure to pollutant or toxic substances is known to induce adverse health effects but few studies have been devoted to the impact on olfactory functioning (Gobba, 2003). As olfactory neuroreceptors are directly in contact with toxic molecules and can regenerate following

destruction (Burd, 1993; Ducray et al., 2002; Giannetti et al., 2004; Herzog and Otto, 1999), an evaluation of damage/recovery on sensitive and histological changes of olfactory function appears as a complementary tool to long-term chronic effects studies.

Actually, effects of toluene inhalation on human health have been extensively described (Boey et al., 1997; Einav et al., 1997; Eller et al., 1999; Filley et al., 2004; Fornazzari et al., 1993; Kang et al., 2005; Muttray et al., 2005; Ørbæk et al., 2005; Plenge-Bonig and Karmaus, 1999; Seeber et al., 2005; Taher et al., 1974), and the last representative overview with many citations on occupational toluene effects has been published recently (Meyer-Baron, 2005). In contrast, few studies

\* Corresponding author.

*E-mail address:* [gerard.brand@univ-fcomte.fr](mailto:gerard.brand@univ-fcomte.fr) (G. Brand).

have dealt with the influence of this pollutant, with great intranasal trigeminal activation properties, on olfactory function (Mergler and Beauvais, 1992; Smith and Duncan, 1992). Toluene is a clear, colorless liquid with a distinctive smell which is widely used for both domestic and industrial purposes. Inhalation is the primary route of toluene exposure for the general population and for occupationally exposed individuals. The largest source of emissions to air is gasoline in which toluene is used of as an octane booster (Fishbein, 1988). In working environment the highest current levels of toluene are found in the printing, painting, automotive, shoemaking and speaker-manufacturing industries (Pierce et al., 1998). Toluene is also a common indoor contaminant due to releases from common household products (paints, paint thinners or adhesives) and from cigarette smoke (ATSDR, 1989). Toluene, like a growing number of pollutants, such as CO<sub>2</sub> (Cain and Murphy, 1980) is a respiratory irritant in both animals and humans, which means that it strongly stimulates another part of the chemical sensitivity, i.e. the trigeminal system (Doty et al., 1978). Exposure to toluene in air is known to result principally in central nervous system dysfunctions (Boey et al., 1997; Ogata et al., 1999). In this field, the neurological (Antti-Poika et al., 1985; Juntunen et al., 1985), neurobehavioral (Baelum et al., 1985; Boey et al., 1997; Cherry et al., 1983; Dick et al., 1984; Zupanic et al., 2002) and neurophysiological (Antti-Poika et al., 1985; Juntunen et al., 1985) effects induced by different levels of toluene exposure have been extensively described and discussed. Despite the considerable research made over the last decades to determine the complex relationships between toluene environmental exposure and health, much less is known about the sense of smell. Nevertheless, the olfactory neurons are the only neurosensory cells directly in contact with external environment. Moreover, the olfactory neurons are known to be renewed by neurogenesis from local neuronal progenitors (Crews and Hunter, 1994) and offer the opportunity to assess the recovery of olfactory function as after classical olfactory epithelium destruction by ZnSO<sub>4</sub> (Ducray et al., 2002).

In previous studies, exposure to other volatile chemicals (especially occupational exposure) has been associated with impairment of olfactory function suggested by two kinds of evidence. One comes from animal toxicological studies. Indeed, many studies have demonstrated selective and dose-dependent histopathological alterations in the nasal cavity from experimental exposure to a diverse range of chemical substances, e.g. chlorine (Wolf et al., 1995), methylethylketoxime (Newton et al., 2001, 2002), methyl bromide (Hurtt et al., 1988), formaldehyde (Monticello et al., 1991) or isobutyralde-

hyde (Abdo et al., 1998). The second kind of evidence comes from assessment of workers who are occupationally exposed to chemical vapors. Several studies have reported problems with sense of smell or apparent decrements on measures of olfactory function in individuals and/or populations occupationally exposed to toxic compounds such as cadmium (Friberg, 1948, 1950; Mascagni et al., 2003), ammonia (Prudhomme et al., 1998), chromium (Kitamura et al., 2003), acrylate and methacrylate (Schwartz et al., 1989) or solvents mixtures (Schwartz et al., 1990). However, few studies have already focused on histopathological damages to the olfactory epithelium with functional modifications of the ability to smell estimated by behavioral measurements. Thus, this work was designed to evaluate in mice the potential modification of the olfactory function following a prolonged toluene exposure. The relevance of this study is that the effects of toluene inhalation on mice olfactory function are evaluated at both sensitive/perceptive and cellular levels. Specifically, sensitive changes (olfactory sensitivity tests using discrimination between toluene odor and water in a maze), were assessed in association with histopathological analyses including cell death and thickness of olfactory neuroepithelium.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Subjects

Subjects were 20 experimentally naive female OF-1 mice (Charles-River, France), 14 weeks old at the beginning of the study. Upon arrival at the animal facility, mice were leg-tattooed for identification purposes and acclimatized for 2 weeks prior to initiation of the study. Animals were housed 10 per cage in two polycarbonate cages with stainless steel wire lids; rodent pellet chow and tap water were available ad libitum throughout the study, including the exposure chamber. All animals were maintained under a 12-h light/12-h dark cycle (testing conducted during the light phase) at 23–25 °C under relatively constant humidity.

### 2.2. Toluene exposure system

Mice whole body inhalation exposure was conducted in a chamber (dark plastic box; 50 cm long, 42 cm wide and 40 cm deep; volume = 0.084 m<sup>3</sup>) in an experimental room. Chamber airflow entered through two rubbers tubing (5 m length; 1 cm diameter) into two sides of the chamber to allow continuous air revival during the toluene exposure period. Pure toluene was placed on cotton in a Plexiglass® holder with 10 small holes drilled in the face and hanging on the chamber lid. This holder was chosen so that the odor could move into the chamber while the animals could not physically get in touch with the cotton.

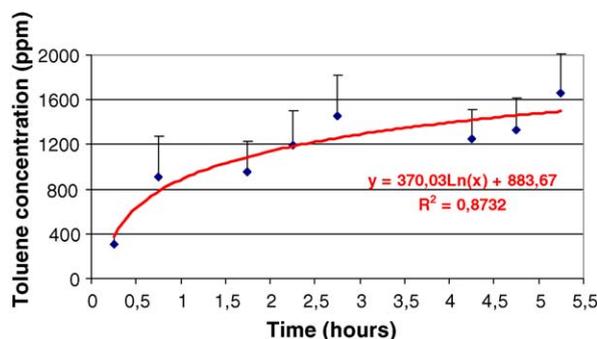


Fig. 1. Toluene concentration in the inhalation chamber during 5 h (this curve is representative of all exposure days whatever the number of animals in the chamber). (◆) Mean  $\pm$  S.E.M.

Mice (in their rearing cages) were placed in the inhalation chamber to toluene [ $C_6H_5CH_3$ ; molecular weight = 92.15; Sigma] for 5 h/day (from 9 a.m. to 2 p.m.), 5 days/week (no weekend exposures) for 4 weeks. Considering the required concentration (see Section 2.3), 8 ml of toluene were poured onto the cotton.

### 2.3. Toluene concentration and gas chromatographic analyses

As in the environment toluene rapidly biodegrades (half-life: 60 h in atmosphere) and does not tend to bio-accumulate, the toluene concentration in the inhalation chamber was measured in a pre-study by gas chromatography. Samples of chamber's air, taken at 30-min intervals during 5 h (exposure period) were injected and analyzed in a gas chromatograph (Varian, Star 3400 CX) equipped with a Supelco Wax column ( $60\text{ m} \times 25\ \mu\text{m}$ ) and a flame-ionization detector. The  $49\ \mu\text{l}$  of chamber's air were collected in a Hamilton syringe and completed with  $1\ \mu\text{l}$  of liquid methylundecanoate used as an internal standard. The  $50\ \mu\text{l}$  sample was immediately injected in the chromatograph. The column followed a ramped temperature profile. The initial temperature was  $50\ ^\circ\text{C}$  for 0.1 min followed by a  $3\ ^\circ\text{C}/\text{min}$  ramp to  $100\ ^\circ\text{C}$  for 0.1 min and a  $6\ ^\circ\text{C}/\text{min}$  ramp to  $230\ ^\circ\text{C}$ , final temperature, for 20 min. After different tests with and without animals in the chamber and in the same conditions (temperature, pressure, humidity), the results revealed that 8 ml of toluene were required to obtain a severe exposure running from 400 to 1600 ppm during the exposure period. Several repeated analyses led to draw Fig. 1 showing a logarithmic increase of toluene concentration in the chamber. This high dose of toluene was not chosen to focus on threshold limit value (TLV), but to reveal potential damages on different peripheral and central levels, i.e. cellular and behavioral consequences.

### 2.4. Experimental design

Mice olfactory sensitivity to toluene was evaluated each Monday morning in three sessions: (a) before exposure

(Week 0) to determine whether the odorants tested were repulsive or not for mice); (b) after each week of exposure (Weeks 1–4) to determine the possible modifications of mice olfactory sensitivity and (c) during 4 weeks following the exposure duration named “recovery period” (Week 5–8). During the exposure and the recovery periods, every Monday morning two mice were removed from the sample and used for histological examination of their olfactory epithelium.

### 2.5. Olfactory sensitivity assessment

Olfactory sensitivity to toluene was evaluated using a T-shaped maze with two dark arms containing each a watch-glass with a filter paper soaked with either  $200\ \mu\text{l}$  distilled water (control compartment) or  $200\ \mu\text{l}$  of 10% toluene. The odorant and control were randomly distributed in the right and left arm at each test. The maze was carefully washed with alcohol after each test. Each mouse was placed in the start-arm at the end of the stem and then allowed to move freely for 5 min. Movements of mice were video recorded and analyzed with a *Video Tracking System for Automation of Behavioral Experiments* (EthoVision<sup>®</sup>, Noldus). Data collected concerned the total time spent by each mouse in each arm.

### 2.6. Histological analyses

**Tissue preparation:** Animals were killed by an intraperitoneal injection of chloral (0.1 ml, 3 M) and subsequently decapitated. Olfactory epithelium and bulbs were dissected and immediately fixed by immersion in 4% paraformaldehyde in phosphate buffer saline (pH 7.4) (PBS) for 12 h at  $4\ ^\circ\text{C}$ . The fixed tissues were rinsed twice in PBS for 10 min, dehydrated and embedded in paraffin. Transverse serial sections of  $7\ \mu\text{m}$  thickness were cut on a microtome, starting from tip of olfactory epithelium. Sections were placed on gelatin-coated slides, deparaffinized and rehydrated. The rehydrated sections were stained with fresh 1% hematoxylin for 2 min, dehydrated and coverslipped.

**Epithelium morphometric measurements:** Three antero-posterior zones were delimited in epithelium to assess damage level due to toluene exposure. Thus, serial sections of whole epithelium were divided in three parts corresponding to the anterior, medial and posterior zones of olfactory epithelium. For each zone, three sections were analyzed as to obtain nine morphometric analyzes all along the olfactory epithelium. Two parameters were collected on sections. First, number of stained nuclei (hematoxylin 0.1%) was counted in a surface represented by  $90\ \mu\text{m}$  large and the whole height of the epithelium (variable according weeks) under a microscope (Leitz orthoplan,  $100\times$  enlargement) equipped with a graduated optical scale. The cell densities were finally calculated for a  $1000\ \mu\text{m}^2$  area as a standard. Second, olfactory epithelium thickness was measured from the basal lamina (between chorion and epithelium) to the apex.

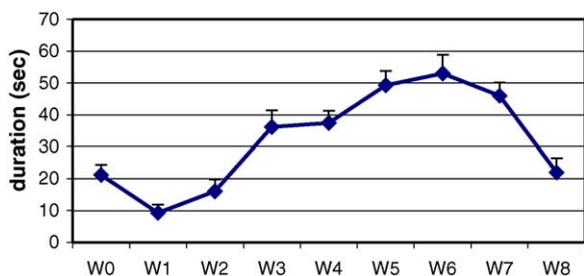


Fig. 2. Changes in stay durations in toluene vs. water compartment in 5 min test sessions, before (W0), during (W1–W4) and after (W5–W8) exposure to toluene in mice.

### 2.7. Statistical analyses

Data were statistically evaluated with a computer program (Statview 5.0) using analysis of variance (ANCOVA and ANOVA) with repeated measures. Post hoc analyses following significant ANCOVA or ANOVA effects were conducted using Fisher PLSD tests, noted as *F*. Results were noted as means  $\pm$  standard errors. The non significant analyses were noted as ns.

## 3. Results

### 3.1. Olfactory sensitivity

The results are reported in Fig. 2. The ANCOVA yielded a significant effect of week factor [ $F(2, 16) = 12.134$ ;  $P < 0.0001$ ]. Before exposure (W0), mice significantly avoided the toluene compartment compared to water compartment ( $21.21 \pm 2.39$  s versus  $58.00 \pm 4.67$  s of presence;  $F = 19.70$ ;  $P < 0.0003$ ). Thus, toluene as a repulsive odor was compared to the non odorant water control. Despite the modifications that occurred during (W1–W4) and after (W5–W8) the expo-

Table 1

Mean of duration in toluene and water compartments (in 5 min session tests) before (W0), during (W1–W4) and after (W5–W8) exposure to toluene in mice

	Toluene	Water	<i>p</i>	Percentages <sup>a</sup>
W0	21.21	58	0.0003	26.78
W1	9.28	80.35	0.0001	10.35
W2	16.05	69.79	0.0001	18.70
W3	36.15	68.05	0.004	34.69
W4	37.41	79.41	0.0005	32.02
W5	49.26	84.51	0.006	36.82
W6	52.96	93.74	0.004	36.10
W7	45.95	90.97	0.004	33.56
W8	22.03	129.5	0.0001	14.54

<sup>a</sup> Percentages = duration in toluene compartment/(duration in toluene compartment + duration in water compartment).

sure to toluene, post hoc PLSD tests showed that the difference between duration in water and toluene compartments were always significant (Table 1).

Time spent by mice in toluene compartment varied significantly during and after exposure (Fig. 2). The curve showed an increase of toluene compartment avoidance at W1 compared to W0. Subsequently, from W2 to W6, i.e. the entire exposure period and the two first weeks of recovery period, the stay duration in toluene compartment increased regularly. From W6 to W8, the inversion of the curve at the end of recovery period reached W0 value (Table 2). In contrast, all comparisons between W0 and the 3 weeks W5, W6, W7 were significant. In addition, when all distribution times of animals were considered (i.e. in toluene and in water compartments) the percentages of time spent in the toluene compartment (Table 2) showed the same evolution from week to week.

Table 2

Duration differences in toluene compartment (in 5 min session tests) before (W0), during (W1–W4) and after (W5–W8), exposure to toluene in mice

	W1	W2	W3	W4	W5	W6	W7	W8
W0	-11.9	-5.1	+14.9	+16.1	+28.1**	+31.7**	+24.7*	+0.8
W1		+6.7	+26.8**	+28.1**	+39.9***	+43.7***	+36.6**	+12.7
W2			+20.1*	+21.3*	+33.2**	+36.9**	+29.9*	+5.9
W3				+1.2	+13.1	+16.8	+9.8	-14.1
W4					+47.1**	+56.3***	+8.5	-15.3
W5						+3.7	-3.3	-27.2
W6							-7.0	-30.9*
W7								-23.9

\*  $P < 0.05$ .

\*\*  $P < 0.01$ .

\*\*\*  $P < 0.001$ .

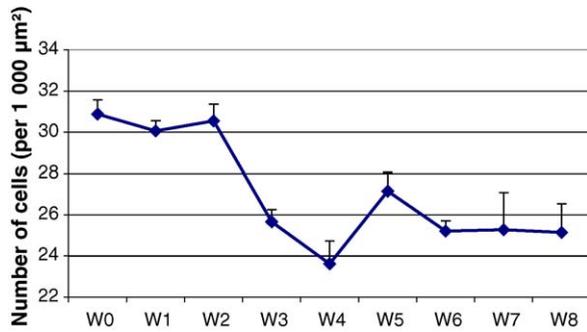


Fig. 3. Evolution of number of cells in olfactory epithelium before (W0), during (W1–W4) and after (W5–W8) toluene exposure in mice.

### 3.2. Histological measures

**Number of cells:** The results are reported in Figs. 3 and 4. The ANOVA revealed a significant effect of week factor [ $F(8, 40) = 19.76, P < 0.0001$ ] and no effect of zone factor [ $F(2, 10) = 0.12, ns$ ]. A significant interaction was observed between both factors [ $F(16, 80) = 6.136, P < 0.0001$ ]. Post hoc PLSD tests showed that there were no difference between W0, W1 and W2. In contrast, the cell densities for these 3 weeks were systematically higher than those of the following weeks (W3–W8). Specifically, the results showed a decrease of cell density during W3 and W4. At W5 (first recovery week), the cell density increased and remained stable for the 3 following weeks but at a low level compared to W0.

**Thickness of epithelium:** The results (Figs. 4 and 5) showed a stable thickness from W5 to W8 which was smaller than the thickness from W0 to W3. Specifically, the thickness from W0 to W3 appeared versatile insofar as it decreased at W1 and increased at W2 and W3. The ANOVA revealed a significant effect of week factor [ $F(8, 40) = 43.84, P < 0.0001$ ] and a significant effect of zone factor [ $F(2, 10) = 8.024, P < 0.0006$ ]. A significant interaction was observed between both factors [ $F(16, 80) = 3.795, P < 0.0001$ ].

Post hoc PLSD tests showed that the results were different according to zones. The anterior and medial zones showed similar changes during weeks and the results at W4 appeared systematically different compared to other weeks (Fig. 6a and b). In contrast, there were no significant differences of thickness in the posterior zone (Fig. 6c).

Moreover, morphological aspect of olfactory epithelium presented characteristics of inflammatory mechanism in W2, W3 and W4. Especially, enlarged gaps beginning in W2 and reaching a maximum in W4 (arrows

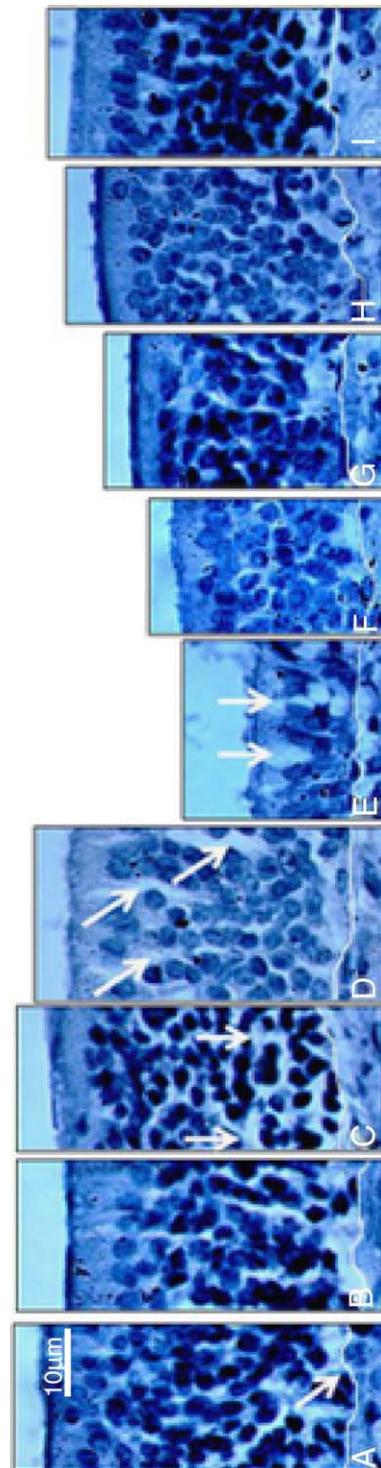


Fig. 4. Histological aspect of olfactory neuroepithelium (100× enlargement) from W0 (A) to W8 (I). (A) The arrow indicates the basal lamina. (C–E) The arrows indicate the presence of gaps into the neuroepithelium.

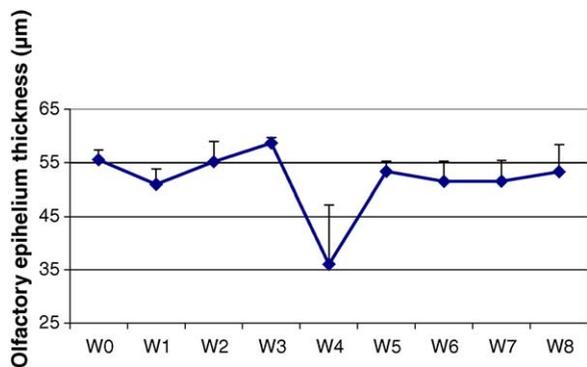


Fig. 5. Evolution of olfactory epithelium thickness (calculated for three zones) before (W0), during (W1–W8) and after (W5–W8) toluene exposure in mice.

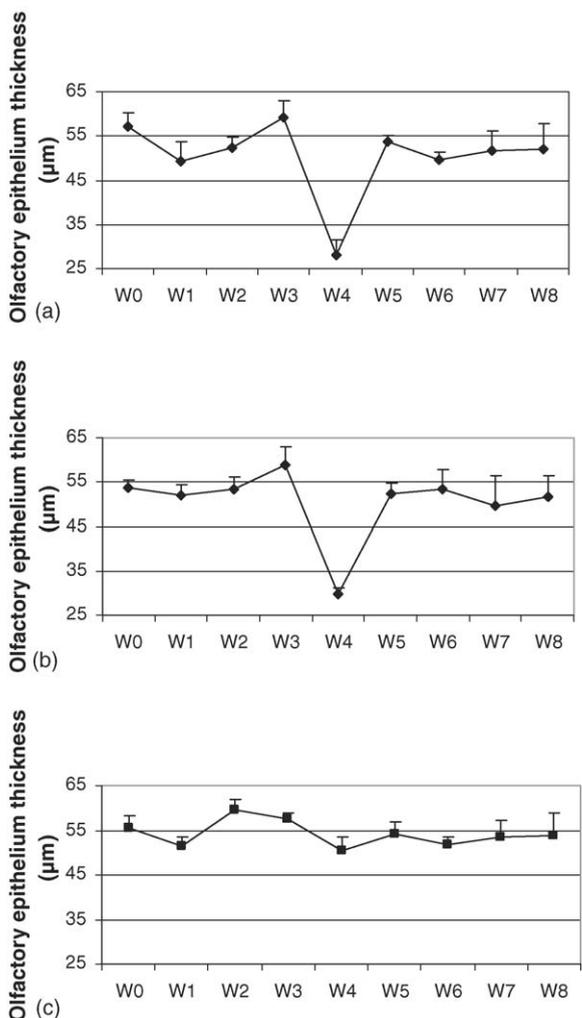


Fig. 6. Evolution of olfactory epithelium thickness before (W0), during (W1–W4) and after (W5–W8) toluene exposure in mice. (a) Anterior zone, (b) medial zone, (c) posterior zone.

on Fig. 4) revealed a disorganization process of the epithelium structure.

#### 4. Discussion

The results of the present study indicate that toluene exposure induces impairment of mice chemosensory sensitivity. These findings are consistent with other works suggesting that a decline of olfactory and trigeminal functions occurred for long-term exposure to organic solvents (Gobba, 2003). Firstly, in this work, behavioral evaluation showed a constant decrease of toluene sensitivity during all the 4 weeks (W1–W4) of exposure which continued during the 2 weeks after the exposure (W5 and W6). The continued decrease during W5 and W6 could be due to the time necessary for cell regeneration processes, as explain later according to histological results.

In contrast, during the last 2 weeks (W7 and W8) of the experiment, the sensitivity of mice to toluene went back to normal. Thus, the recovery of chemosensory function appeared to occur rapidly after the end of exposure. In such experiment, learning or addictive processes could not be excluded. Therefore, in the present work, these potential events were minimized by the following considerations. First, toluene and water stimuli were randomly distributed in the maze. Second, learning or addictive processes would be represented by a linear (decrease or increase) distribution of mice in the maze along the whole experiment, which was not observed.

Secondly, behavioral measurements of sensitivity are in a great part associated with histopathological changes of olfactory neuroepithelium, even if data do not coincide strictly on the timescale. Indeed, structural modifications, i.e. density of cells and thickness of epithelium were observed soon from the outset of exposure. More precisely, the number of cells did not change during the first 2 weeks of exposure (W1 and W2) and decreased markedly during the third and fourth weeks (W3 and W4). At the first week of the recovery period (W5), the density increased significantly (but stayed lower than the W0-normal density) and remained stable during the following weeks (W6–W8). Concerning the thickness of neuroepithelium, the results of the first week of exposure (W1) showed a decrease followed in W2 and W3 by an increase suggesting an inflammatory process. In contrast, the results of W4 revealed an abrupt decrease of the thickness whereas the return to normal arose immediately at the outset of recovery period.

The results of the present study are in agreement with other published works which observed modifications in olfactory perception in rodents after exposure

to pollutant and pungent substances such as methyl bromide (Hurt et al., 1988), 3-methyl indole (Owens et al., 1996) or hydrogen sulfide (Brenneman et al., 2000). In the same way, from an histological point of view, the majority of toxicological studies in rodents showed damages into olfactory neuroepithelium following exposure to styrene (Cruzan et al., 1997, 2001), isobutyraldehyde (Abdo et al., 1998), chlorine (Jiang et al., 1983) or ethanol and cigarette smoke (Vent et al., 2003, 2004). In the present work, toluene inhalation induced histological lesions characterized by degeneration processes and loss of olfactory epithelial cells that led to a decrease of the epithelium thickness, as already observed with other pollutants (Cruzan et al., 1997; Hardisty et al., 1999; Newton et al., 2001; Vent et al., 2003). The cellular loss concerned principally the olfactory sensory neuroreceptors due to necrosis (Abdo et al., 1998; Cruzan et al., 2001) and apoptosis processes (Vent et al., 2004). Thus, after toluene exposure in mice the relation between decrease of sensitivity and modifications in histological changes cell density and thickness of epithelium is congruent with the previous cited works. However, further studies are needed – especially with different exposure conditions (i.e. concentration, duration, ...) – in order to explore widely effects of toluene exposure on chemosensory sensitivity. Indeed, in the present work, the described effects are related to an acute toluene exposure.

Concerning the thickness of epithelium, the data showed a zone-depending effect (anterior, median and posterior). Toluene exposure led changes in anterior and median zones whereas no such effects have been observed in the posterior zone. This fact is also in agreement with other studies which indicated that the severity of damages on olfactory epithelium followed an antero-posterior gradient (Abdo et al., 1998; Monticello et al., 1991; Newton et al., 2002). Finally, the results showed that at the end of the recovery period, the thickness of epithelium get back to normal. In contrast, the cell density did not return to the initial level which was expected as the time course of post-lesional regeneration processes last more than 4 weeks (Gaskell, 1990).

The fact that olfactory perception could be modified by airborne pollutants is not surprising since the neuroreceptors are located in a relatively unprotected position. Moreover, inhalation is the primary route in central nervous system effects (Cruz et al., 2003; Lopez-Rubalcava et al., 2000) and it has been shown that toluene can modify some perception mechanisms (Cruz et al., 2001). In humans, psychophysical studies have also demonstrated olfactory functional impairment in occupationally exposed workers (Dalton et al., 2003; Wysocki et al., 1997). However, due to substance specific mechanisms,

some chemicals produced chemosensory impairment whereas some other had no effects. The concentration in the atmosphere plays a major role on the potential effects and the time-course of chemosensory effects appears different in relation to the molecules. Moreover, concerning the concentration and the time-course, the dissociation of olfactory and trigeminal components appears relevant and could be considered in further research. Indeed, odors are generally regarded as transient (due to desensitization) without clinical relevance whereas sensory irritations are regarded as adverse effects in inhalation toxicology. Finally, olfactory impairment seems to be highly dependent on chemicals, possibly in relation to the interactions of olfactory and trigeminal processes in the nasal cavity (Brand, 2006). Thus, further research dealing with acute chemosensory effects could be divided into intranasal sensory irritation and odor effects.

## References

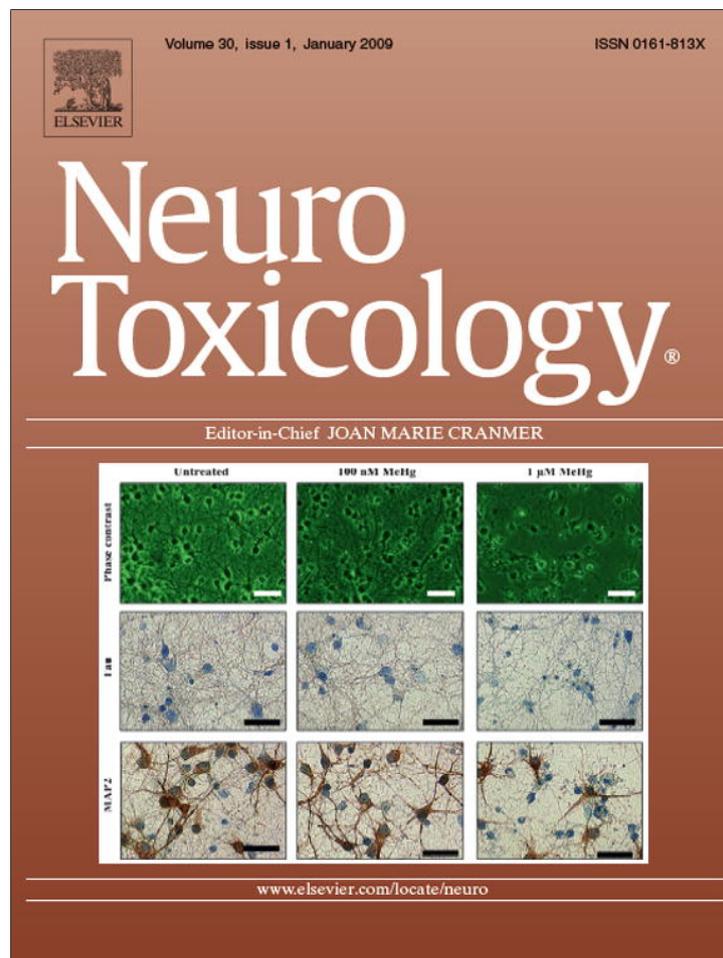
- Abdo, K.M., Haseman, J.K., Nyska, A., 1998. Isobutyraldehyde administered by inhalation (whole body exposure) for up to thirteen weeks or two years was a respiratory tract toxicant but was not carcinogenic in F344/N rats and B6C3F1 mice. *Toxicol. Sci.* 42, 136–151.
- Antti-Poika, M., Juntunen, J., Matikainen, E., Suoranta, H., Hänninen, H., Seppäläinen, A.M., Liira, J., 1985. Occupational exposure to toluene: neurotoxic effects with special emphasis on drinking habits. *Int. Arch. Occup. Environ. Health* 56, 31–40.
- Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR), 1989.
- Baelum, J., Andersen, I., Lundqvist, G.R., Molhave, L., Pedersen, O.F., Vaeth, M., Wyon, D.P., 1985. Response of solvent-exposed printers and unexposed controls to six-hour toluene exposure. *Scand. J. Work. Environ. Health* 11, 271–280.
- Boey, K.W., Foo, S.C., Jeyaratnam, J., 1997. Effects of occupational exposure to toluene: a neuropsychological study on workers in Singapore. *Ann. Acad. Med. Singapore* 26, 184–187.
- Brand, G., 2006. Olfactory/trigeminal interactions in nasal chemoreception. *Neurosci. Biobehav. Rev.*
- Brenneman, K.A., James, R.A., Gross, E.A., Dorman, D.C., 2000. Olfactory neuron loss in adult male CD rats following sub-chronic inhalation exposure to hydrogen sulfide. *Toxicol. Pathol.* 28, 326–333.
- Burd, G.D., 1993. Morphological study of the effects of intranasal zinc sulfate irrigation on the mouse olfactory epithelium and olfactory bulb. *Microsc. Res. Tech.* 24, 195–213.
- Cain, W.S., Murphy, C.L., 1980. Interaction between chemoreceptive modalities of odour and irritation. *Nature* 284, 255–257.
- Cherry, N., Johnston, J.D., Venables, H., Waldron, H.A., 1983. The effects of toluene and alcohol on psychomotor performance. *Ergonomics* 26, 1081–1087.
- Crews, L., Hunter, D., 1994. Neurogenesis in the olfactory epithelium. *Perspect. Dev. Neurobiol.* 2, 151–161.
- Cruz, S.L., Paez-Martinez, N., Pellicer, F., Salazar, L.A., Lopez-Rubalcava, C., 2001. Toluene increases acute thermociception in mice. *Behav. Brain Res.* 120, 213–220.

- Cruz, S.L., Gauthereau, M.Y., Camacho-Munoz, C., Lopez-Rubalcava, C., Balster, R.L., 2003. Effects of inhaled toluene and 1,1,1-trichloroethane on seizures and death produced by *N*-methyl-D-aspartic acid in mice. *Behav. Brain Res.* 140, 195–202.
- Cruzan, G., Cushman, J.R., Andrews, L.S., Granville, G.C., Miller, R.R., Hardy, C.J., Coombs, D.W., Mullins, P.A., 1997. Subchronic inhalation studies of styrene in CD rats and CD-1 mice. *Fundam. Appl. Toxicol.* 35, 152–165.
- Cruzan, G., Cushman, J.R., Andrews, L.S., Granville, G.C., Johnson, K.A., Bevan, C., Hardy, C.J., Coombs, D.W., Mullins, P.A., Brown, W.R., 2001. Chronic toxicity/oncogenicity study of styrene in CD-1 mice by inhalation exposure for 104 weeks. *J. Appl. Toxicol.* 21, 185–198.
- Dalton, P., Cowart, B., Dilks, D., Gould, M., Lees, P.S.J., Stefaniak, A., Emmett, E.A., 2003. Olfactory function in workers exposed to styrene in the reinforced-plastics industry. *Am. J. Ind. Med.* 44, 1–11.
- Dick, R.B., Setzer, J.V., Wait, R., Hayden, M.B., Taylor, B.J., Tolos, B., Putz-Anderson, V., 1984. Effects of acute exposure of toluene and methyl ethyl ketone on psychomotor performance. *Int. Arch. Occup. Environ. Health* 54, 91–109.
- Doty, R.L., Brugger, W.P.E., Jurs, P.C., Orndorff, M.A., Snyder, P.J., Lowry, L.D., 1978. Intranasal trigeminal stimulation from odorous volatiles: psychometric responses from anosmics and normal humans. *Physiol. Behav.* 20, 175–185.
- Ducray, A., Bondier, J.R., Michel, G., Bon, K., Millot, J.L., Propper, A., Kastner, A., 2002. Recovery following peripheral destruction of olfactory neurons in young and adult mice. *Eur. J. Neurosci.* 15, 1907–1917.
- Einav, S., Amitai, Y., Reichman, J., Geber, D., 1997. Bradycardia in toluene poisoning. *J. Toxicol. Clin. Toxicol.* 35, 295–298.
- Eller, N., Netterstrom, B., Laursen, P., 1999. Risk of chronic effects on the central nervous system at low toluene exposure. *Occup. Med.* 49, 389–395.
- Filley, C.M., Halliday, W., Kleinschmidt-DeMasters, B.K., 2004. The effects of toluene on the central nervous system. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 63, 1–12.
- Fishbein, L., 1988. Toluene: uses, occurrence and exposure. In: Fishbein, L., O'Neill, I.K. (Eds.), *Environmental Carcinogens: Methods of Analysis and Exposure Measurement*. Benzene and Alkylated Benzenes, vol. 10. International Agency for Research on Cancer, IARC Sci. Publ. No. 85.
- Fornazzari, L., Wilkinson, D.A., Kapur, B.M., Carlen, P.L., 1993. Cerebellar, cortical and functional impairment in toluene abusers. *Acta Neurol. Scand.* 67, 319–329.
- Friberg, L., 1948. Proteinuria and kidney injury among workmen exposed to cadmium and nickel dust. *J. Ind. Hyg. Toxicol.* 30, 32–36.
- Friberg, L., 1950. Health hazards in manufacture of alkaline accumulators with special reference to chronic cadmium poisoning. *Acta Med. Scand.* 138, 1–124.
- Gaskell, B.A., 1990. Nonneoplastic changes in the olfactory epithelium-experimental studies. *Environ. Health Perspect.* 85, 275–289.
- Giannetti, N., Moyse, E., Ducray, A., Bondier, J.R., Jourdan, F., Propper, A., Kastner, A., 2004. Accumulation of Ym1/2 protein in the mouse olfactory epithelium during regeneration and aging. *Neuroscience* 123, 907–917.
- Gobba, F., 2003. Occupational exposure to chemicals and sensory organs: a neglected research field. *Neurotoxicology* 24, 675–691.
- Hardisty, J.F., Garman, R.H., Harkema, J.R., Lomax, L.G., Morgan, K.T., 1999. Histopathology of nasal olfactory mucosa from selected inhalation toxicity studies conducted with volatile chemicals. *Toxicol. Pathol.* 27, 618–627.
- Herzog, C., Otto, T., 1999. Regeneration of olfactory receptor neurons following chemical lesion: time course and enhancement with growth factor administration. *Brain Res.* 849, 155–161.
- Hurt, M.E., Thomas, D.A., Working, P.K., Monticello, T.M., Morgan, K.T., 1988. Degeneration and regeneration of the olfactory epithelium following inhalation exposure to methyl bromide: pathology, cell kinetics, and olfactory function. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 94, 311–328.
- Jiang, X.Z., Buckley, L.A., Morgan, K.T., 1983. Pathology of toxic responses to the RD50 concentration of chlorine gas in the nasal passages of rats and mice. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 71, 225–236.
- Juntunen, J., Matikainen, E., Antti-Poika, M., Suoranta, H., Valle, M., 1985. Nervous system effects of long-term occupational exposure to toluene. *Acta Neurol. Scand.* 72, 512–517.
- Kang, S.K., Rohlman, D.S., Lee, M.Y., Lee, Y.S., Chung, S.Y., Anger, W.K., 2005. Neurobehavioral performance in workers exposed to toluene. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 19, 645–650.
- Kitamura, F., Yokoyama, K., Araki, S., Nishikitani, M., Choi, J.W., Yum, Y.T., Park, H.C., Park, S.H., Sato, H., 2003. Increase of olfactory threshold in plating factory workers exposed to chromium in Korea. *Ind. Health* 41, 279–285.
- Lopez-Rubalcava, C., Hen, R., Cruz, S.L., 2000. Anxiolytic-like actions of toluene in the burying behavior and plus-maze tests: differences in sensitivity between 5-HT(1B) knockout and wild-type mice. *Behav. Brain Res.* 115, 85–94.
- Mascagni, P., Consonni, D., Bregante, G., Chiappino, G., Toffoletto, F., 2003. Olfactory function in workers exposed to moderate airborne cadmium levels. *Neurotoxicology* 24, 717–724.
- Mergler, D., Beauvais, B., 1992. Olfactory threshold shift following controlled 7-hour exposure to toluene and/or xylene. *Neurotoxicology* 13, 211–215.
- Meyer-Baron, M., 2005. A meta-analytical approach to neurobehavioral effects of occupational toluene exposure. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 19, 651–657.
- Monticello, T.M., Miller, F.J., Morgan, K.T., 1991. Regional increases in rat nasal epithelial cell proliferation following acute and subchronic inhalation of formaldehyde. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 111, 409–421.
- Muttray, A., Spelmeyer, U., Hommel, G., Oesch, F., Jung, D., Rose, D.M., Mayer-Popken, O., Rossbach, B., Letze, S., 2005. Acute exposure to 50 ppm toluene does not increase sleepiness. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 19, 665–669.
- Newton, P.E., Wooding, W.L., Bolte, H.F., Derelanko, M.J., Hardisty, J.F., Rinehart, W.E., 2001. A chronic inhalation toxicity/oncogenicity study of methylethylketoxime in rats and mice. *Inhal. Toxicol.* 13, 1093–1116.
- Newton, P.E., Bolte, H.F., Derelanko, M.J., Hardisty, J.F., Rinehart, W.E., 2002. An evaluation of changes and recovery in the olfactory epithelium in mice after inhalation exposure to methylethylketoxime. *Inhal. Toxicol.* 14, 1249–1260.
- Ogata, M., Michitsuji, H., Fujiki, Y., 1999. Estimating amounts of toluene inhaled by workers with protective mask using biological indicators of toluene. *Toxicol. Lett.* 108, 233–239.
- Ørbæk, P., Persson, R., Österberg, K., 2005. Impact of trait anxiety and social conformity on responses to experimental chemical challenge. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 19, 659–664.
- Owens, J.G., James, R.A., Moss, O.R., Morgan, K.T., Bowman, J.R., Struve, M.F., Dorman, D.C., 1996. Design and evaluation of an olfactometer for the assessment of 3-methylindole-induced hyposmia. *Fundam. Appl. Toxicol.* 33, 60–70.

- Pierce, C.H., Dills, R.L., Morgan, M.S., Vicini, P., Kalman, D.A., 1998. Biological monitoring of controlled toluene exposure. *Int. Arch. Occup. Environ. Health* 71, 433–444.
- Plenge-Bonig, A., Karmaus, W., 1999. Exposure to toluene in the printing industry is associated with subfecundity in women but not in men. *Occup. Environ. Med.* 56, 443–448.
- Prudhomme, J.C., Shusterman, D., Blanc, P.D., 1998. Acute-onset persistent olfactory deficit resulting from multiple overexposures to ammonia vapor at work. *J. Am. Board Fam. Pract.* 11, 66–69.
- Schwartz, B.S., Doty, R.L., Monroe, C., Frye, R., Barker, S., 1989. Olfactory function in chemical workers exposed to acrylate and methacrylate vapors. *Am. J. Public Health* 79, 613–618.
- Schwartz, B.S., Ford, D.P., Bolla, K.I., Agnew, J., Rothman, N., Bleecker, M.L., 1990. Solvent-associated decrements in olfactory function in paint manufacturing workers. *Am. J. Ind. Med.* 18, 697–706.
- Seeber, A., Demes, P., Kiesswetter, E., Schäper, M., van Thriel, C., Zupanic, M., 2005. Changes of neurobehavioral and sensory functions due to toluene exposure below 50 ppm? *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 19, 635–643.
- Smith, D.V., Duncan, H.J., 1992. Primary olfactory disorders: anosmia, hyposmia, and dysosmia. In: Serby, M.J., Chobor, K.L. (Eds.), *Science of Olfaction*. Springer-Verlag, New York, pp. 439–466.
- Taher, S.M., Anderson, R.J., McCartney, R., Popovtzer, M.M., Schrier, R.W., 1974. Renal tubular acidosis associated with toluene “sniffing”. *N. Engl. J. Med.* 290, 765–768.
- Vent, J., Bartels, S., Haynatzki, G., Gentry-Nielsen, M.J., Leopold, D.A., Hallworth, R., 2003. The impact of ethanol and tobacco smoke on intranasal epithelium in the rat. *Am. J. Rhinol.* 17, 241–247.
- Vent, J., Robinson, A.M., Gentry-Nielsen, M.J., Conley, D.B., Hallworth, R., Leopold, D.A., Kern, R.C., 2004. Pathology of the olfactory epithelium: smoking and ethanol exposure. *Laryngoscope* 114, 1383–1388.
- Wolf, D.C., Morgan, K.T., Gross, E.A., Barrow, C., Moss, O.R., James, R.A., Popp, J.A., 1995. Two-year inhalation exposure of female and male B6C3F1 mice and F344 rats to chlorine gas induced lesions confined to the nose. *Fundam. Appl. Toxicol.* 24, 111–131.
- Wysocki, C.J., Dalton, P., Brody, M.J., Lawley, H.J., 1997. Acetone odor irritation thresholds obtained from acetone-exposed factory workers and from control (occupationally unexposed) subjects. *Am. Ind. Hyg. Assoc. J.* 58, 704–712.
- Zupanic, M., Demes, P., Seeber, A., 2002. Psychomotor performance and subjective symptoms at low level toluene exposure. *Occup. Environ. Med.* 59, 263–268.

## **ANNEXE 2**

Provided for non-commercial research and education use.  
Not for reproduction, distribution or commercial use.



This article appeared in a journal published by Elsevier. The attached copy is furnished to the author for internal non-commercial research and education use, including for instruction at the authors institution and sharing with colleagues.

Other uses, including reproduction and distribution, or selling or licensing copies, or posting to personal, institutional or third party websites are prohibited.

In most cases authors are permitted to post their version of the article (e.g. in Word or Tex form) to their personal website or institutional repository. Authors requiring further information regarding Elsevier's archiving and manuscript policies are encouraged to visit:

<http://www.elsevier.com/copyright>



## Inhalation exposure to acetone induces selective damage on olfactory neuroepithelium in mice

G. Buron, R. Hacquemand, G. Pourié, G. Brand\*

Laboratoire de Neurosciences, Université de Franche-Comté, Place Leclerc, 25000 Besançon, France

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 17 April 2008

Accepted 6 November 2008

Available online 21 November 2008

#### Keywords:

Acetone inhalation

Olfactory neuroepithelium

Behavioral sensitivity

OMP

PCNA

### ABSTRACT

Due to their specific position in the nasal cavity, the cells of olfactory neuroepithelium can be damaged by exposure to environmental airborne chemicals. However, few studies have been focused on selective damage, i.e. olfactory sensory neurons, basal cells, supporting and duct cells. As solvents are known to induce critical effects on olfactory neuroepithelium (OE), this study was designed to characterize histological and immunohistological effects induced by acetone exposure on OE in mice. Behavioral tests were conducted to evaluate olfactory sensitivity. Moreover, olfactory neuroepithelium was examined to evaluate the thickness and the total number of cells. Finally, different markers, olfactory marker protein (OMP) and proliferating cell nuclear antigen (PCNA), were used to characterize respectively olfactory sensory neurons and basal cells, and secondly to evaluate the dynamic of the tissue turnover. Results showed structural modifications, since the thickness and the number of cells in the OE were modified according to the time course of the exposure. Additionally, no changes for OMP-positive cells were observed whereas significant differences appeared for the density of PCNA-positive cells in relation to their location (main-body or basal layer of OE). These findings indicate that acetone exposure induces selective damage in olfactory neuroepithelium.

© 2008 Elsevier Inc. All rights reserved.

### 1. Introduction

The mammalian olfactory system possesses the remarkable capacity to recognize and discriminate among thousands of distinct odorant molecules. The sense of smell provides to the organism informations about external environment which are essential for survival and can influence animal's behavior and physiology. Indeed, smell carries vital cues about food sources, predators, territories, and additionally social signals implied in reproductive and maternal functions, as well as in recognition of conspecifics (Tirindelli et al., 1998).

The main olfactory system detects via the main olfactory neuroepithelium (OE) a large variety of volatile chemicals commonly defined as odorants. The main OE consists of six morphologically and biochemically distinct cell types: olfactory neuron cells, horizontal and globose basal cells, sustentacular cells, microvillar cells and duct cells of Bowman's glands (Carr et al., 1991). Receptor cells have the capacity to undergo continuous replacement throughout the animal's lifespan (Wilson and Raisman, 1980; Barber, 1981) by an olfactory neurogenesis which

originates in progenitor basal cells situated close to the basal lamina (Carter et al., 2004).

Contrary to other neurons, olfactory neurons are directly exposed to a large number of environmental airborne substances, including irritant and cytotoxic gases, vapors and particles. This vulnerable position can lead to acute, subacute and chronic damage in structure and function of olfactory system (Witek, 1993). During inhalation, nasal tissues are exposed to chemicals which can affect the longevity of the olfactory neurons. Many chemicals have neurotoxic properties and a large variety of volatile chemicals have been reported to induce histopathologic changes in the olfactory mucosa of rodents (Bogdanffy et al., 1997; Lomax et al., 1997). Several studies have shown that environmental contaminants (Bascom et al., 1995) and industrial chemicals (Gaskell et al., 1988) caused nasal lesions or tumors in experimental animals. Recently, it has been shown that toluene induced morphological and histological changes in the mouse olfactory mucosa (Jacquot et al., 2006), but recovery of chemosensory function appeared to occur rapidly after the end of toluene exposure.

Acetone is a colorless, highly volatile, flammable liquid with a sweet pungent odor. The estimated half-life of acetone in the blood is 5 h, estimates of the volatilization half-life from surface waters range from 7.8 to 18 h, and the half-life in atmosphere is 22 days. Acetone is used in numerous industrial processes as an intermediate in the production of methylacrylates, Bisphenol A, chloroform and

\* Corresponding author. Tel.: +33 81 66 57 52.

E-mail address: gerard.brand@univ-fcomte.fr (G. Brand).

other ketones and as solvent. After inhalation, acetone is rapidly absorbed by the respiratory tract and widely distributed to all tissues. Acetone is not considered to be genotoxic or mutagenic (World Health Organization, 1998).

Studies in humans reported different symptoms in relation to concentration and duration of acetone exposure, especially neuropsychological effects in workers (Kiesswetter et al., 1994; Satoh et al., 1996). Other studies reported irritation of eyes, nose and throat by exposure to acetone for concentrations ranging from 250 to 1000 ppm (Dalton et al., 1997; Mitran et al., 1997). Acute exposure of workers to acetone concentrations higher than 12,000 ppm for up to 4 h has been reported to produce unconsciousness, dizziness, unsteadiness, confusion and headache (Ross, 1973). Studies in rodents showed that acetone is of a low order of acute inhalation toxicity (4-h LC50 in rats: 32,000 ppm) (Pozzani et al., 1959). Inhalation exposure of rats to a concentration of 19,000 ppm for 8 weeks was necessary to obtain reversible brain modification.

In this work, concentration and duration of exposure in relation to the previous data were chosen in order to assess the effect of acetone inhalation on olfactory function in mice. Damage of the OE caused by the chemicals exposure have been reported, but the effects of acetone on OE in mice are not well-described. In order to clarify this point, behavioral tests, using corridor-shape maze were conducted. Histological analyses were realised, including measurements of the thickness and the number of cells in the OE. Finally, immunohistological observations were used to provide information about the evolution of olfactory mature neurons and proliferative cells by using different markers respectively olfactory marker protein (OMP) and proliferating cell nuclear antigen (PCNA).

## 2. Materials and methods

### 2.1. Animals

Experiments were conducted with forty female OF-1 mice (purchased from Charles-River, France), 12 weeks old at the beginning of the study. Mice were divided randomly in three groups: groups 1, 2 and 3, of respectively 10, 20 and 10 animals. Group 1 is a control group, where mice were exposed to fresh air only. Group 2 served for behavioral experiment and group 3 for histological studies. Animals were housed in two home polycarbonate cages with stainless steel wire lids, at a constant temperature of  $22 \pm 1$  °C in a husbandry, under a cycle with a light phase of 12 h from 8 a.m. to 8 p.m., with free access to food and water.

### 2.2. Gas chromatographic analyses

Acetone concentration was measured in the inhalation chamber by gas chromatography using a Micro GC (Varian-CP 4900). Samples of chamber's air, taken at 1-h intervals, were injected and analysed at constant temperature (160 °C) and pressure (150 kPa) with helium as vector gas. As concentration was suspected to be not homogeneous in the chamber's air, five complete tests of 5 h were conducted in different points, at the same height corresponding to the presence of animals. Data were analysed with a standard of 100 ppm acetone. Results (Fig. 1) showed increasing concentrations during the first 1.5 h and relative constant acetone concentrations around 8000 ppm from 1.5 to 5 h exposure period.

### 2.3. Experimental design

The entire experiment was conducted during 8 weeks divided in two periods: 4 weeks of acetone exposure followed by 4 weeks

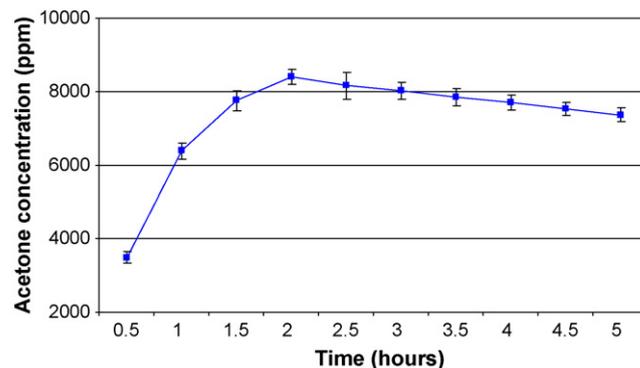


Fig. 1. Acetone concentration in the inhalation chamber during 5 h. Mean  $\pm$  standard error.

of post-exposure period. Data were collected before acetone exposure (W0), during the exposure (W2 and W4) and during the post-exposure period (W6 and W8).

### 2.4. Acetone exposure system

Groups 2 and 3 were exposed to acetone for 4 weeks, 5 h per day (from 9 a.m. to 2 p.m.), 5 days per week (from Monday to Friday). Mice were placed in an inhalation chamber (long: 80 cm, wide: 42 cm, deep: 41 cm, volume = 0.13 m<sup>3</sup>). Mice were let in their cage with food and water *ad libitum*, so that animals did not have physical contact with acetone. 4 mL of pure acetone (C<sub>3</sub>H<sub>6</sub>O, molecular weight: 58.09, Sigma) was placed on a cotton in a glass in the inhalation chamber. Two silicone hoses (1 m length, 1 cm diameter) placed into two sides of the inhalation chamber allow a passive ventilation during the acetone exposure period.

### 2.5. Behavioral experiments

Olfactory sensitivity was evaluated on groups 1 and 2 every 2 weeks (from W0 to W8) using a corridor-shape maze (60 cm in length, 7 cm in breadth, 7 cm in height) as in a previous work (Buron et al., 2007). In both extremities, a watch-glass was placed with a filter paper with either 190  $\mu$ L of distilled water (control area), acetone (thinning: 10% acetone, 90% water), male OF-1 mice urine (obtained just before the behavioral tests: the animal was held by the scruff of the neck over a plastic funnel and gently applying pressure to the abdomen, as processed in classical studies using urine) or butanol (thinning: 10% butanol, 90% water). The odorant and control were randomly distributed in the right and left arm at each test. After each test, corridor-shape maze was carefully washed with alcohol and dried. Each mouse was placed at the middle of the corridor-shape maze and allowed to move freely for 3 min. Movements of mice were video recorded and analysed with Ethovision Noldus software, a video tracking system for automation of behavioral experiments. Data collected concerned the total time spent by mice in each half part of the corridor (named "odor" compartment and "water" compartment).

### 2.6. Histological studies

#### 2.6.1. Dissection and tissues preparation

Every 2 weeks, two mice from group 3 were sacrificed. Mice were injected intraperitoneally with 1 mL of chloral 3 M. After decapitation, the whole nasal cavity tissue was collected from the tip to the ending connexion with the olfactory bulb. The OE was removed and disconnected from the respiratory epithelium. Then OE (as a one-piece intact tissue) was fixed by immersion in 4% paraformaldehyde in phosphate buffer saline (PBS1x) for 12 h at

4 °C. The fixed tissue was rinsed twice with PBS1x for 20 min and decalcified by immersion in decalcifying solution/medium (composition: 10% hydrochloric acid) for 12 h. Then the tissue was rinsed twice with PBS1x for 20 min and embedded in paraffin, with respect to the initial orientation of the OE. Transverse serial sections of 10 µm were cut on a microtome and placed on gelatine-coated slides.

### 2.6.2. Coloration

The gelatine-coated slides were deparaffinized and re-hydrated. The re-hydrated sections were stained with hematoxylin for 1 min, dehydrated and mounted in histolaque.

### 2.6.3. Histological measurements

The whole OE of each mouse sacrificed was divided in 3 zones according to the initial orientation (anterior, medial and posterior OE). Nine slides for each zone were taken for histological measurements or immunohistochemistry. So, 27 sections for each animal (9 slides per 3 zones) were analysed with Lucia G software, observed under a microscope (Leitz orthoplan, 40× enlargement) and treated in a systematic approach. Two parameters were collected in the middle of both ventral–dorsal and medial–lateral axes of each slide. First, OE thickness was measured from the basal lamina to the apex (see Fig. 7) by examining the structure of the hematoxylin-stained olfactory mucosa. Second, the number of stained nuclei was counted for an area of 1000 µm<sup>2</sup>. In order to address this fixed area, the maximum height available on tissue (including the whole OE from the basal lamina to the apex) was considered and the length was adapted by the software to fix 1000 µm<sup>2</sup>.

## 2.7. Immunohistochemistry

### 2.7.1. Tissue preparation

The gelatine-coated slides were deparaffinized and re-hydrated. The slides were first rinsed in PBS1x, treated with 0.1% Triton X-100 during 30 min and rinsed again in PBS1x. Tissues were blocked for 10 min with 1% bovine serum albumin (BSA) and 30 min with vector mouse blocking reagent in PBS1x (used to block endogenous mouse antibody in the tissue section). Tissues were then incubated for 20 h at 4 °C under wet atmosphere with anti-olfactory marker protein (1:200, Wako Chemicals, Richmond, VA, USA) combined with anti-proliferating cell nuclear antigen (monoclonal antibody, 1:50, Chemicon International) diluted in 1% BSA. The slides were rinsed with PBS1x and incubated for 2 h at room temperature with secondary antibodies conjugated with fluorescein isothiocyanate (FITC, 1:100, Dako) for the OMP detection and with tetra-methyl rhodamine iso-thio-cyanate (TRITC, 1:100, Sigma–Aldrich) for the PCNA detection. Finally, slides were rinsed again with PBS1x and mounted.

### 2.7.2. Immunohistochemical measurements

To evaluate the number of mature olfactory sensory cells, OMP-positive cells were counted for an area of 1000 µm<sup>2</sup> in the main-body of OE. To observe cell proliferation in the OE, immunoreactivity to PCNA, a widely used marker for cell proliferation, was measured. As proliferative cells originate from the basal layer and replace degenerating cells in the whole epithelium, we quantified PCNA-positive cells in two localizations, i.e. the basal layer close to the basal lamina, and the main-body (see Fig. 7). PCNA-positive cells were quantified for an area of 1000 µm<sup>2</sup> in the main-body of OE, and for a length of 500 µm in the basal layer.

### 2.7.3. Image acquisition and processing

The slides were examined using Olympus BX 51 microscope equipped with Olympus camera DP5 and Analysis software.

## 2.8. Statistical analysis

Data were analysed by analysis of variance (ANOVA) with repeated measures and *post hoc* were made with Scheffé tests, using Statview 5.0 statistical software. The data were expressed as means of total duration (in s) ± standard errors. *p*-Values of less than 0.05 were considered significant. The non-significant analyses were noted as ns.

## 3. Results

### 3.1. Behavioral measures of olfactory function

For acetone (Fig. 2), the 2 (group) × 5 (week) ANOVA with repeated measures revealed a group effect [ $F(1, 171) = 25.27$ ,  $p < 0.0001$ ], a week effect [ $F(4, 116) = 2.761$ ,  $p < 0.03$ ] and a significant interaction between both factors [ $F(4, 684) = 2.759$ ,  $p < 0.03$ ]. *Post hoc* Scheffé tests showed no difference between control and exposed animals at W0 before exposure [ $F(28) = 0.034$ , ns] but significant differences between both groups during exposure at W2 [ $F(28) = 7.123$ ,  $p < 0.01$ ] W4 [ $F(28) = 5.593$ ,  $p < 0.03$ ] and after exposure at W6 [ $F(28) = 16.57$ ,  $p < 0.0004$ ] and W8 [ $F(28) = 8.878$ ,  $p < 0.006$ ].

For butanol (Fig. 3), the 2 (group) × 5 (week) ANOVA with repeated measures revealed no significant group effect [ $F(1, 171) = 1.49$ , ns] but a week effect [ $F(4, 116) = 3.145$ ,  $p < 0.01$ ]. No significant interaction was observed between both factors [ $F(4, 684) = 0.525$ , ns].

For urine (Fig. 4), the 2 (group) × 5 (week) ANOVA with repeated measures revealed no group effect [ $F(1, 171) = 0.228$ , ns], no week effect [ $F(4, 116) = 1.61$ , ns] and no significant interaction between both factors [ $F(4, 684) = 1.09$ , ns].

### 3.2. Histological measurements

Regarding the total number of cells in OE, the ANOVA revealed a significant effect of week factor [ $F(4, 265) = 62.087$ ,  $p < 0.0001$ ]. *Post hoc* Scheffé tests showed a significant decrease in number of cells at W2 (Fig. 5). At W4, the cellular density increased, remained stable at W6 and finally increased again at W8.

Regarding the thickness of OE, the ANOVA revealed a significant effect of week factor [ $F(4, 265) = 21.625$ ,  $p < 0.0001$ ]. *Post hoc* Scheffé tests showed a stable thickness between W0 and W2. Then

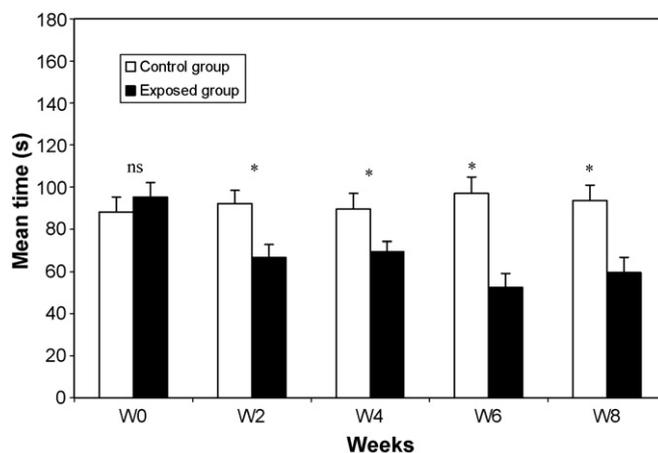
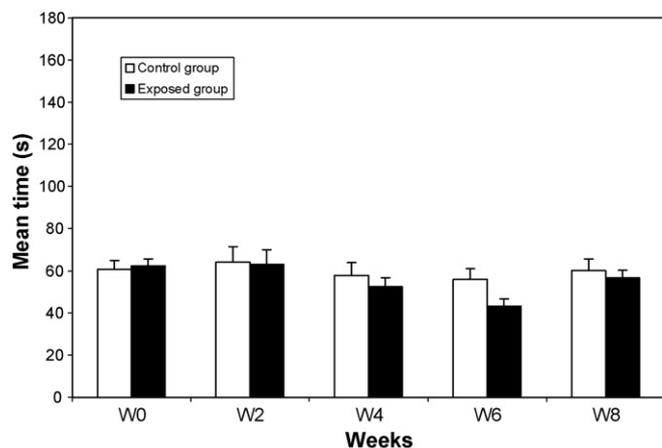


Fig. 2. Behavioral sensitivity to acetone evaluated in corridor-maze divided in two compartments (acetone and control). Evolution of the mean time spent by control group ( $n = 10$ ) and exposed group ( $n = 20$ ) of animals in acetone compartment (vs control compartment) before (W0), during (W2, W4) and after (W6, W8) a 5 h/day–5 days/week acetone exposure (ns: non-significant; \* $p < .05$ ).



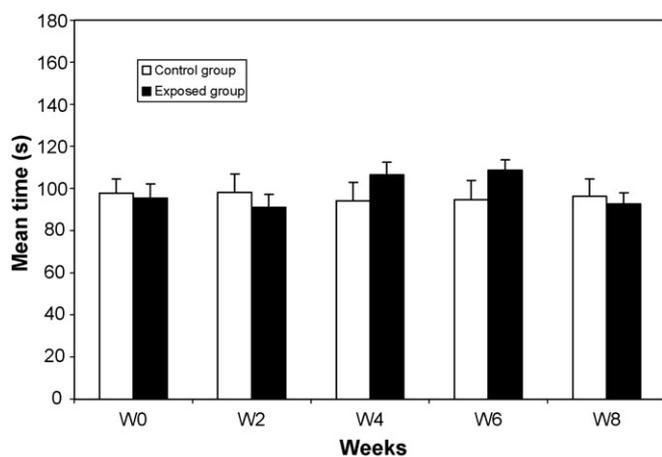
**Fig. 3.** Behavioral sensitivity to butanol evaluated in corridor-maze divided in two compartments (butanol and control). Evolution of the total time spent by control group ( $n = 10$ ) and exposed group ( $n = 20$ ) of animals in butanol compartment before (W0), during (W2, W4) and after (W6, W8) a 5 h/day–5 days/week acetone exposure. Statistical analyses showed no group effect.

significantly, it decreased at W4, increased at W6 and decreased again at W8 (Fig. 6). The values at W8 were not significantly different to those recorded at W0.

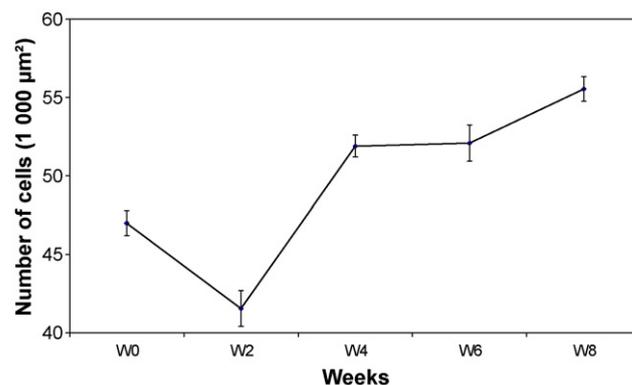
### 3.3. Immunohistological evaluation

OMP is expressed nearly exclusively in mature olfactory sensory cells (Farbman and Margolis, 1980; Margolis, 1982; Menco, 1989). Immunological studies with anti-OMP (Figs. 7 and 8) revealed no significant difference in OMP immunopositive olfactory sensory cells before (W0), during (W2–W4) and after (W6–W8) the exposure [ $F(4, 40) = 0.847$ , ns].

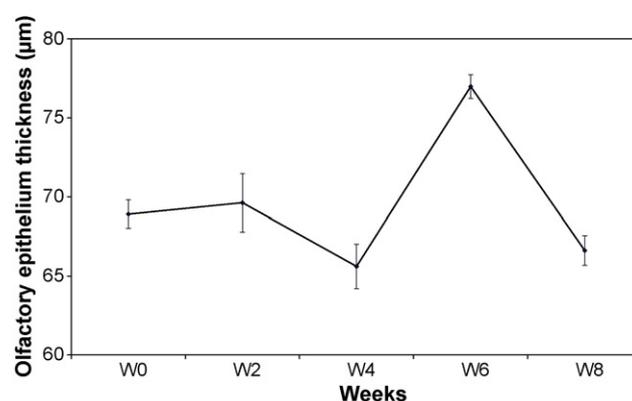
PCNA acts as an auxiliary protein to DNA polymerase delta. The ANOVA revealed a significant effect of week factor [ $F(4, 40) = 24.495$ ,  $p < 0.0001$ ] concerning the number of PCNA-positive cells in the basal layer of OE. *Post hoc* Scheffé tests showed a significant decrease during the acetone exposure period (W2–W4) and at the middle of post-exposure period (W6). This number increased at the end of the experiment (W8) (Fig. 7 and Fig. 9) and recovered control values. Furthermore, the following anecdotal finding must be noted: at the middle of acetone exposure (W2),



**Fig. 4.** Behavioral sensitivity to urine evaluated in corridor-maze divided in two compartments (urine and control). Evolution of the total time spent by control group ( $n = 10$ ) and exposed group ( $n = 20$ ) of animals in urine compartment before (W0), during (W2, W4) and after (W6, W8) a 5 h/day–5 days/week acetone exposure. Statistical analyses showed no group effect.



**Fig. 5.** Evolution of total cell number of the whole OE before (W0), during (W2, W4) and after (W6, W8) a 5 h/day–5 days/week acetone exposure: significantly lower at W2, and significantly higher at W4, W6 and W8.



**Fig. 6.** Evolution of the olfactory epithelium thickness before (W0), during (W2, W4) and after (W6, W8) a 5 h/day–5 days/week acetone exposure: no week effect although a decrease at W4 and an increase at W6 appeared.

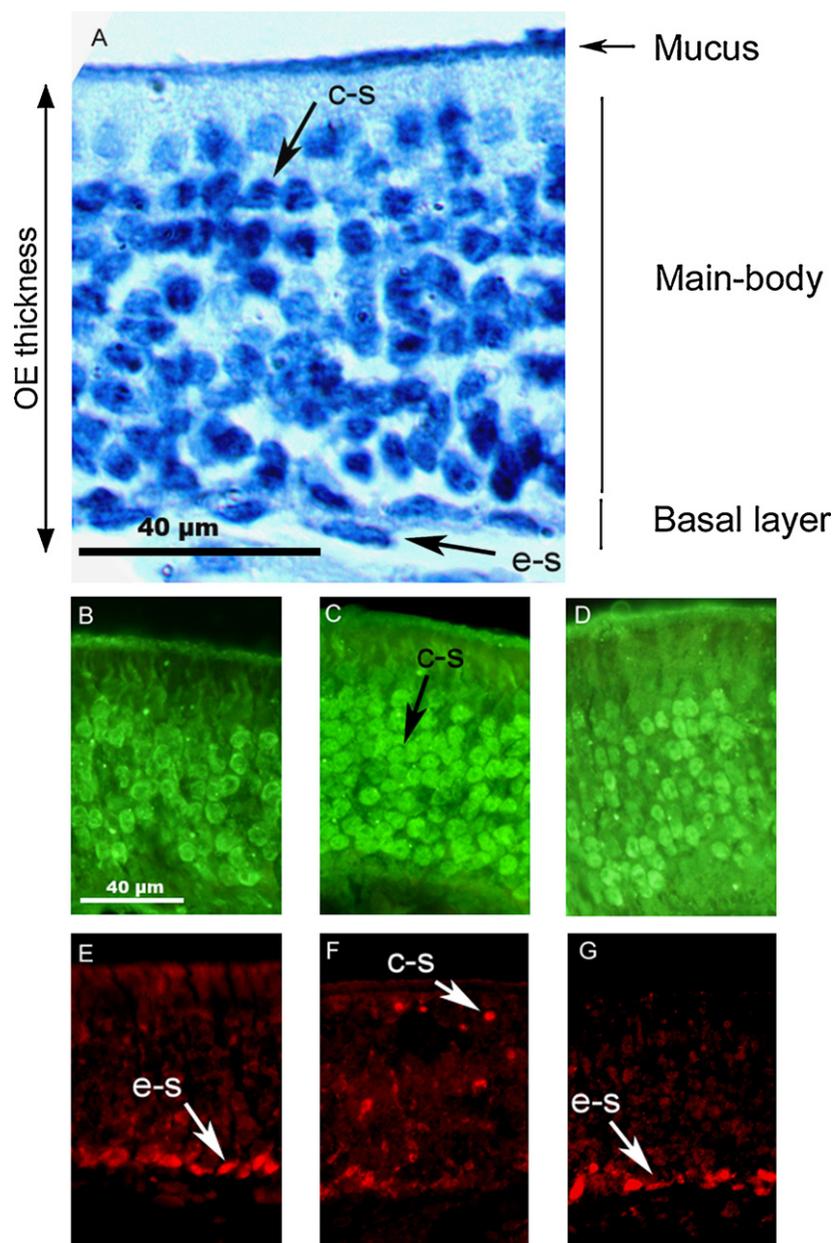
some PCNA-positive cells were identified consistently across sections in the OE main-body (see Fig. 7F) of both animals sacrificed, which was never the case at W0, W4, W6 and W8.

## 4. Discussion

In the present study, the effects of subchronic acetone exposure on OE of mice were evaluated. Results showed modifications of olfactory functions revealed by three concomitant analyses, i.e. behavioral, histological and immunohistochemical analyses.

From a behavioral point of view, data showed a decrease of the time spent in the acetone compartment during (W2–W4) and after (W6–W8) exposure. No such effect was observed for butanol odor and urine odor. These findings suggested an increasing avoidance to acetone odor possibly due to sensitization insofar as acetone is a well-known trigeminal nerve stimulant. The behavioral data concerning butanol (a mixed olfactory/trigeminal nerve stimulant with a low power of irritation) and urine (a conspecific cue acting specially via the accessory olfactory system) suggested no olfactory sensitivity changes in relation to acetone exposure.

From an histological point of view, the number of OE cells (whatever their phenotype) decreased during the exposure (W2). At the end of the acetone exposure period (W4), a significant increase occurred and the number of cells remained stable during the post-exposure period (W6–W8). Moreover, results showed delayed modifications of the OE thickness (during W4/W6) compared to the global cellular densities dynamics. At the end



**Fig. 7.** Structural and immunochemical investigation of olfactory epithelium of mice. (A) Hematoxylin staining showing the structure of the epithelium. Note that the shape of nuclei is different according to the cell-layers; i.e. cells of the basal layer show an elongated-shaped nucleus (e-s) and the cells of the main-body layer show a circular-shape (c-s) nucleus (60× magnification). (B, C and D) OMP-positive cells at respectively W0, W2 and W8 (40× magnification). (E, F and G) PCNA-positive cells at respectively W0, W2 and W8 (40× magnification).

of the post-exposure period (W8), the OE thickness came back to the normal level (W0).

From an immunohistological point of view, the OMP-(in main-body of OE) and PCNA- (in the basal layer and in the main-body of OE) positive cells were quantified. During the whole experiment, the number of OMP-positive cells remained stable, showing no effect of acetone exposure on mature olfactory neurons. In contrast, the number of PCNA-positive cells rapidly decreased during acetone exposure (W2–W4) in the basal layer. These results indicated a decrease of the mitotic activity of progenitor cells, known to be located in OE basal layer. Concerning the main-body layer, no PCNA-positive cells were found during the experiment, except at W2.

Taken together, these findings showed that acetone exposure had an impact on nasal chemosensory functions in mice and induced selective cell damage. Olfactory neuroreceptors were not

altered whereas the sustentacular cells may be affected. The presence of PCNA-positive cells in the main-body at W2 showed that the OE started a mitotic activity as earlier as the beginning of the acetone exposure. The evolution of PCNA-positive number cells during acetone exposure explained modifications observed in OE thickness during the post-exposure period. Indeed, the increasing number of PCNA-positive cells at W2 could be related to the increase of total number of cells at W4. PCNA-positive cells may give rise to new cells that had to be inserted in the OE. This observation could explain the disorganization of OE and the thickness increase at W6.

These findings are in agreement with the previously published works (World Health Organization, 1985) indicating a neurotoxic effect associated with exposure to acetone. Previous studies have reported that acetone was harmful only to the central nervous system (American Conference of Governmental Industrial Hygiene,

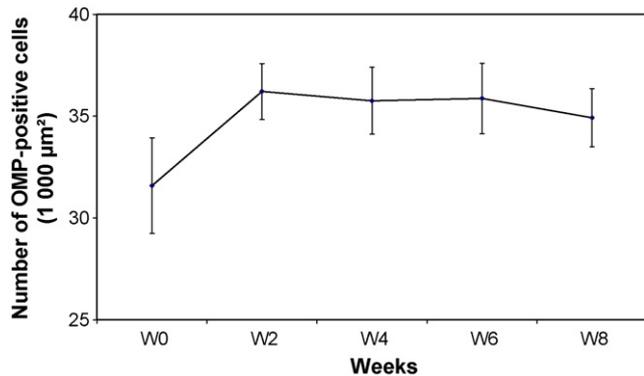


Fig. 8. Evolution of the number of OMP-positive cells in wholebody of olfactory epithelium before (W0), during (W2, W4) and after (W6, W8) a 5 h/day–5 days/week acetone exposure: no week effect.

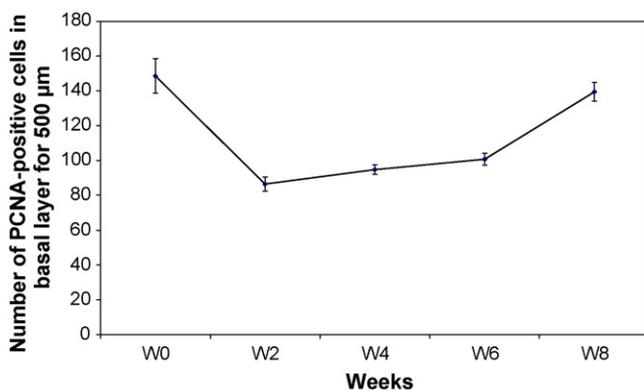


Fig. 9. Evolution of the number of PCNA-positive cells in the basal layer of olfactory epithelium before (W0), during (W2, W4) and after (W6, W8) a 5 h/day–5 days/week acetone exposure: significant decrease at W2, W4, W6, and recovered control values at W8.

nists, 1991; Schaumburg et al., 1992). However, irritative effects of acetone vapor on olfactory mucosa were mainly studied in humans using symptom questionnaires and psychological measurements (Arts et al., 2002). Other studies (Morrow et al., 1990; Ukai et al., 1994) reported neurotoxic syndromes (i.e. mood disorders, memory difficulties, headaches) which indicated the presence of diffuse brain function impairment resulting from exposure to organic solvent mixture, e.g. toluene, methyl ethyl ketone, isopropyl alcohol ethyl or acetate.

In the present study, acetone subchronic exposure leads to behavioral, histological and immunohistological modifications in mice peripheral nervous system. These findings are in agreement with the study of Calderón-Garcidueñas et al. (1998) showing that a local exposure of the nasal tissue to chemicals during inhalation may affect the longevity of OE cells. These results are also in agreement with other studies conducted with several chemicals. Indeed, an increasing number of chemicals are now known to induce extensive morphological changes in the rodent olfactory mucosa (Gaskell, 1990; Renne et al., 2007). Several classes of chemicals have been clearly implicated in altering the smell ability. For instance, an exposure to organic compounds, in particularly solvents like styrene (Cruzan et al., 2002), chloroform (Kasai et al., 2002) or dibasic esters (Hardisty et al., 1999) resulted in toxicity of nasal olfactory cells.

From an immunohistochemical point of view, the analyses of phenotype of cells showed that only basal cells were clearly affected whereas the number of mature neurons stayed unchanged. The decrease of the number of PCNA-positive cells

indicated a decrease of the mitotic activity of basal cells, and not a cellular death. In addition, we hypothesize a loss of sustentacular cells rather than olfactory neurons. This kind of OE alteration has not been extensively described. The results of the present study are in agreement with those of Evans et al. (1995) showing a significant loss of the sustentacular cells after nickel exposure, with a slightly reduction of olfactory mature neurons. In contrast, other studies, conducted with ethanol, isobutylaldehyde or styrene, have revealed that the main cell type affected was the mature neurons by apoptosis (Vent et al., 2004) or necrosis (Cruzan et al., 2001) processes.

It is well known that solvents, owing to their lipophilicity, can readily cross the nasal mucosa and penetrate underlying cellular membranes (Doty and Hastings, 2001). Solvents can also enter the bloodstream through the nasal capillaries and can cross the blood–brain barrier, producing in extreme cases atrophy of central brain structures (Hormes et al., 1986). The recovery of structural integrity and epithelium functionality depends to some degree upon how the tissues beneath the basement membrane are damaged, especially the lamina propria. Uraih et al. (1987) have showed that the Bowman's glands located in the lamina propria are critical in the efficient and complete regeneration of the epithelium in animals exposed to toxic substances affecting the olfactory system. In this regard, an evaluation of the number of Bowman's glands during and after acetone exposure would give information about the processes implied in OE recovery.

Some studies have showed that effects observed on olfactory mucosa after pollutant inhalation are dose- and time-dependent (Newton et al., 2002; Katagiri et al., 2000). Indeed, the degree and depth of injury is specific for each compound. Therefore, modifications of acetone concentrations and time of exposure will be interesting to compare results and determine the mode of action of acetone. Furthermore, it must be noted that acetone exposure effects on the OE and peripheral olfactory system are probably not the only cause of sensitivity distortion. Future research could consider that the olfactory bulb, as the first relay for olfactory information which projects to central structures, could suffer of damage insofar as Bahrami et al. (2000) have demonstrated that a single dose of methylsulfonyl-2,6-dichlorobenzene produced persistent lesions in the olfactory bulb of mice. Finally, the present study focused on the effect of acetone on OE in mice. However, inhalation exposure targets the upper respiratory tract as well as the lung, the liver and the kidney. A number of studies have demonstrated effects of several chemicals, i.e. chloroform (Larson et al., 1994), styrene (Cruzan et al., 2002) or sulfur dioxide (Meng and Liu, 2007) on these organs. In this way, future research may be focused on the accessory olfactory system. This chemical system is composed by vomeronasal organ (VNO), a bilateral tubular structure inserted in a cartilaginous capsule and located at the base of the nasal septum (Boehm, 2006). The structure of the VNO epithelium is similar to that of the main olfactory system. The vomeronasal system plays a role in detection of biologically relevant odors, like pheromones which are found in rodent urine. The present study revealed that acetone exposure had no effect on olfactory sensitivity for urine odor in mice. As the pheromonal signals are processed at the same time by the main and accessory olfactory systems (Touhara, 2007) and as only few studies (Gaafar et al., 1998) have been conducted on pollutant effects on the vomeronasal epithelium, future research may be focused on the effects of chemical exposure on both olfactory and vomeronasal epithelium in order to describe and specify the effects of pollutant exposure on rodent's nasal cavity.

#### Conflicts of interest

None.

## References

- American Conference of Governmental Industrial Hygienists (ACGIH). Acetone, cyclohexanone. 6th ed. Documentation of the threshold limit values and biological exposure indices, vol. 1. 1991.
- Arts JHE, Mojet J, van Gemert LJ, Emmen HH, Lammers JHCM, Marquart J, et al. An analysis of human responses to the irritancy of acetone vapors. *Crit Rev Toxicol* 2002;32:43–66.
- Bahrami F, Bergman U, Brittebo EB, Brandt I. Persistent olfactory mucosal metaplasia and increased olfactory bulb glial fibrillary acidic protein levels following a single dose of methylsulfonyl-dichlorobenzene in mice: comparison of the 2,5- and 2,6-dichlorinated isomers. *Toxicol Appl Pharmacol* 2000;162:49–59.
- Barber PC. Axonal growth by newly-formed vomeronasal neurosensory cells in the normal adult mouse. *Brain Res* 1981;216:229–37.
- Bascom R, Kesavanathan J, Fitzgerald TZ, Cheng KH, Swift DL. Sidestream tobacco smoke exposure acutely alters human nasal mucociliary clearance. *Environ Health Perspect* 1995;103:1026–30.
- Bogdanffy MS, Glanick NL, Kegelmann T, Frame SR. Four-week inhalation cell proliferation study of the effects of vinyl acetate on rat nasal epithelium. *Inhal Toxicol* 1997;9:331–50.
- Boehm U. The vomeronasal system in mice: from the nose to the hypothalamus- and back!. *Semin Cell Dev Biol* 2006;17:471–9.
- Buron G, Hacquemand R, Pourie G, Lucarz A, Jacquot L, Brand G. Comparative behavioral effects between synthetic 2,4,5-trimethylthiazoline (TMT) and the odor of natural fox (*Vulpes vulpes*) feces in mice. *Behav Neurosci* 2007;121:1063–72.
- Calderón-Garcidueñas L, Rodríguez-Alcaraz A, Villarreal-Calderón A, Lyght O, Janszen D, Morgan KT. Nasal epithelium as a sentinel for airborne environmental pollution. *Toxicol Sci* 1998;46:352–64.
- Carr VM, Farbman AI, Colletti LM, Morgan JI. Identification of a new non-neuronal cell type in rat olfactory epithelium. *Neuroscience* 1991;45:433–49.
- Carter LA, MacDonald JL, Roskams AJ. Olfactory horizontal basal cells demonstrate a conserved multipotent progenitor phenotype. *J Neurosci* 2004;23:5670–83.
- Cruzan G, Carlson GP, Johnson KA, Andrews LS, Banton MI, Bevan C, et al. Styrene respiratory tract toxicity and mouse lung tumors are mediated by CYP2F-generated metabolites. *Regul Toxicol Pharmacol* 2002;35:308–19.
- Cruzan G, Cushman JR, Andrews LS, Granville GC, Johnson KA, Bevan C, et al. Chronic toxicity/oncogenicity study of styrene in CD-1 mice by inhalation exposure for 104 weeks. *J Appl Toxicol* 2001;21:185–98.
- Dalton P, Wysocki CJ, Brody MJ, Lawley HJ. Perceived odor, irritation, and health symptoms following short-term exposure to acetone. *Am J Ind Med* 1997;31:558–69.
- Doty RL, Hastings L. Neurotoxic exposure and olfactory impairment. *Clin Occup Environ Med* 2001;1:547–75.
- Evans JE, Miller ML, Andringa A, Hastings L. Behavioral, histological, and neurochemical effects of nickel (II) on the rat olfactory system. *Toxicol Appl Pharmacol* 1995;130:209–20.
- Farbman AI, Margolis FL. Olfactory marker protein during ontogeny: immunohistochemical localization. *Dev Biol* 1980;74:205–15.
- Gaafar H, Tantawy A, Hamza M, Shaaban M. The effect of ammonia on olfactory epithelium and vomeronasal organ neuroepithelium of rabbits, a histological and histochemical study. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec* 1998;60:88–91.
- Gaskell BA. Nonneoplastic changes in the olfactory epithelium—experimental studies. *Environ Health Perspect* 1990;85:275–89.
- Gaskell BA, Hext PM, Pigott GH, Hodge MCH, Tinston DJ. Olfactory and hepatic changes following inhalation of 3-trifluoromethyl pyridine in rats. *Toxicology* 1988;50:57–68.
- Hardisty JF, Garman RH, Harkema JR, Lomax LG, Morgan KT. Histopathology of nasal olfactory mucosa from selected inhalation toxicity studies conducted with volatile chemicals. *Toxicol Pathol* 1999;27:618–27.
- Hormes J, Filley C, Rosenberg N. Neurologic sequelae of chronic solvent vapour abuse. *Neurology* 1986;36:698.
- Jacquot L, Pourie G, Buron G, Monnin J, Brand G. Effects of toluene inhalation exposure on olfactory functioning: behavioral and histological assessment. *Toxicol Lett* 2006;165:57–65.
- Kasai T, Nishizawa T, Arito H, Nagano K, Yamamoto S, Matsushima T, et al. Acute and subchronic inhalation toxicity of chloroform in rats and mice. *J Occup Health* 2002;44:193–202.
- Katagiri T, Takeuchi T, Mine T, Noguchi T, Nishizawa T, Yamamoto S, et al. Chronic inhalation toxicity and carcinogenicity studies of 3-chloro-2-methylpropene in BDF1 mice. *Ind Health* 2000;38:309–18.
- Kiesswetter E, Blaszkewick M, Vangala RR, Seeber A. Acute exposure to acetone in a factory and ratings of well-being. *Neurotoxicology* 1994;15:597–601.
- Larson JL, Wolf DC, Morgan KT, Méry S, Butterworth BE. The toxicity of 1-week exposures to inhaled chloroform in female B6C3F1 mice and male F-344 rats. *Fundam Appl Toxicol* 1994;22:431–46.
- Lomax LG, Krivanek ND, Frame SR. Chronic inhalation toxicity and oncogenicity of methyl methacrylate in rats and hamsters. *Food Chem Toxicol* 1997;35:393–407.
- Margolis FL. Olfactory marker protein (OMP). *Scand J Immunol Suppl* 1982;9:181–99.
- Menco BP. Electron-microscopic demonstration of olfactory-marker protein with protein G-gold in freeze-substituted. Lowicryl K11M-embedded rat olfactory-receptor cells. *Cell Tissue Res* 1989;256:275–81.
- Meng Z, Liu Y. Cell morphological ultrastructural changes in various organs from mice exposed by inhalation to sulfur dioxide. *Inhal Toxicol* 2007;19:543–51.
- Mitran E, Callender T, Orha B, Dragnea P, Botezatu G. Neurotoxicity associated with occupational exposure to acetone, methyl ethyl ketone, and cyclohexanone. *Environ Res* 1997;73:181–8.
- Morrow LA, Ryan CM, Hodgson MJ, Robin N. Alterations of cognitive and psychological functioning after organic solvent exposure. *J Occup Med* 1990;32:444–50.
- Newton PE, Bolte HF, Derelanko MJ, Hardisty JF, Rinehart WE. An evaluation of changes and recovery in the olfactory epithelium in mice after inhalation exposure to methylethylketoxime. *Inhal Toxicol* 2002;14:1249–60.
- Pozzani UC, Carpenter CP, Palm PE, Weil CS, Nair JH. An investigation of the mammalian toxicity of acetonitrile. *J Occup Med* 1959;1:634–42.
- Renne RA, Gideon KM, Harbo SJ, Staska LM, Grumbein SL. Upper respiratory tract lesions in inhalation toxicology. *Toxicol Pathol* 2007;35:163–9.
- Ross DG. Acute acetone intoxication involving eight male workers. *Ann Occup Hyg* 1973;16:73–5.
- Satoh T, Omae K, Nakashima H, Takebayashi T, Matsumura H, Kawai T, et al. Relationship between acetone exposure concentration and health effects in acetate fiber plant workers. *Int Arch Occup Environ Health* 1996;68:147–53.
- Schaumburg HH, Berger AR, Thomas PR. Disorders of peripheral nerves. 2nd ed. Philadelphia: Davis; 1992.
- Schwartz BS, Ford DP, Bolla KI, Agnew J, Rothman N, Bleecker ML. Solvent-associated decrements in olfactory function in paint manufacturing workers. *Am J Ind Med* 1990;18:697–706.
- Tirindelli R, Mucignat-Caretta C, Ryba NJP. Molecular aspects of pheromonal communication via the vomeronasal organ of mammals. *Trends Neurosci* 1998;21:482–6.
- Touhara K. Molecular biology of peptide pheromone production and reception in mice. *Adv Genet* 2007;59:147–71.
- Ukai H, Takada SS, Ikeda M. Occupational exposure to solvent mixtures: effects on health and metabolism. *Occup Environ Med* 1994;51:523–9.
- Uraih LC, Talley FA, Mitsumori K, Gupta BN, Bucher JR, Boorman GA. Ultrastructural changes in the nasal mucosa of Fischer 344 rats and B6C3F1 mice following an acute exposure to methyl isocyanate. *Environ Health Perspect* 1987;72:77–88.
- Vent J, Robinson AM, Gentry-Nielsen MJ, Conley DB, Hallworth R, Leopold DA, et al. Pathology of the olfactory epithelium: smoking and ethanol exposure. *Laryngoscope* 2004;114:1383–8.
- Wilson KC, Raisman G. Age-related changes in the neurosensory epithelium of the mouse vomeronasal organ: extended period of postnatal growth in size and evidence for rapid cell turnover in the adult. *Brain Res* 1980;185:103–13.
- Witek TJ Jr. The nose as a target for adverse effects from the environment: applying advances in nasal physiologic measurements and mechanisms. *Am J Ind Med* 1993;24:649–57.
- WHO (World Health Organization). Organic solvents and the central nervous system. Copenhagen: WHO Regional Office for Europe and the Nordic Council of Ministers; 1985.
- WHO (World Health Organization). Environmental health criteria 207, acetone. Geneva, Switzerland: International Programme on Chemical Safety; 1998.

## **ANNEXE 3**



## Inhalation exposure to pyridine induces enhancement of olfactory neuroreceptors in mice

Journal:	<i>European Journal of Neuroscience</i>
Manuscript ID:	EJN-2009-01-14968
Manuscript Type:	Research Report
Date Submitted by the Author:	21-Jan-2009
Complete List of Authors:	BURON, Gaelle; Universite de Franche-Comte, Lab. Neurosciences POURIE, Gregory; Universite de Franche-Comte, Lab. Neurosciences HACQUEMAND, Romain; Universite de Franche-Comte, Lab. Neurosciences Brand, Gerard; Universite de Franche-Comte, Lab. Neurosciences
Key Words:	behavior, Olfactory receptors, immunohistochemistry



## **Inhalation exposure to pyridine induces enhancement of olfactory neuroreceptors in mice**

Buron G, Hacquemand R, Pourié G, Brand G\*.

Laboratoire de Neurosciences  
Université de Franche-Comté  
Place Leclerc 25000 Besançon –Fr

\*Corresponding author: gerard.brand@univ-fcomte.fr

### Abstract

Olfactory neuroreceptors have the capacity to regenerate continuously along the lifespan by neurogenesis processes starting with progenitor cells close to the basal lamina. The cellular turnover into olfactory neuroepithelium may be modified by environmental stimuli insofar as nasal mucosa is directly in contact with airborne chemicals. However, few studies have been focused on selective changes, especially those concerning mature olfactory neurons and basal cells during specific inhalation exposure. Among chemicals, solvents are known to induce changes in smell abilities and concomitant histological and cellular modifications related to the type of molecule, concentration and time of exposure.

This study was designed to characterize smell sensitivity (using behavioral tests) and immunohistochemical effects on olfactory neuroepithelium induced by pyridine exposure in mice. Olfactory marker protein (OMP) and proliferating cell nuclear antigen (PCNA) were used to characterize respectively mature olfactory neurons and basal cells. Results showed that inhalation exposure to pyridine had no impact on smell sensitivity whatever the concentration used and the time of exposure. These findings were concomitant to immunohistochemical measurements showing the same cellular kinetic whatever the condition of exposition to pyridine, i.e. an increase of OMP-positive cells and a decrease of PCNA-positive cells as early as the beginning of exposure and cell amounts remained stable at this level until the end of exposure. These findings suggest that pyridine could have the property to rapidly activate a cellular turnover from basal cells without cell damage. Rather than toxic effects, the present findings suggest that the metabolites of pyridine might have cell cycle inhibitory properties.

Key words: Pyridine - Olfactory neuroepithelium - Behavioral sensitivity - OMP - PCNA.

## Introduction

Volatile molecules and airborne chemicals enter the nose and can interact with olfactory neuroepithelium in the nasal cavity. Specially, exposure to pollutant or toxic substances can induce adverse health effects but few studies have been devoted to the impact on olfactory functioning (Gobba, 2003). In rodents, the peripheral part of the main olfactory system is a pseudo-stratified neuroepithelium located in the posterior nasal cavity lining the cartilaginous turbinates and septum. Six morphologically and biochemically distinct cell types have been described (Carr et al., 1991; Holbrook et al., 1995): olfactory sensory neurons, globose basal cells, horizontal basal cells, supporting cells, microvillar cells and duct cells of Bowman's gland. Among them, olfactory sensory neurons (Buck and Axel., 1991; Buck, 2000) constitute the receptor cells for odorant molecules involved in the processes of signal transduction using G protein-coupled receptors located on ciliated dendrites. As olfactory neurons are directly in contact with toxic molecules and can regenerate continuously, an evaluation of the effects on olfactory neuroreceptors and sensitivity appears as a complementary tool to long-term chronic effect studies. Indeed, olfactory neuroreceptors are replaced throughout the lifespan (Farbman, 1990) as well as following destruction (Burd, 1993; Ducray et al., 2002; Giannetti et al., 2004; Herzog and Otto, 1999) by a neurogenic process starting with progenitor cells, named basal cells, located close to the basal lamina (Carter et al., 2004).

Many chemicals have neurotoxic properties and a large variety of volatile chemicals have been reported to induce histopathological changes in the olfactory mucosa of rodents (Bogdanffy et al., 1997; Lomax et al., 1997; Monticello et al., 1990). Specifically, organic solvents have been considered as a major source of impairment (Schwartz et al., 1990). Experimental studies using inhalation exposure to solvents reported lesions into the olfactory neuroepithelium, i.e. acrylate (Schwartz et al., 1989), styrene (Cruzan et al., 2001), glutaraldehyde (Gross et al., 1994), perchloroethylene (Aoki et al., 1994), chloroform (Kasai et al., 2002). Recently, it has been shown that toluene induced morphological and histological changes in the mouse olfactory mucosa (Jacquot et al., 2006), but recovery of chemosensory function appeared to occur rapidly after the end of exposure. Another study (Buron et al., 2008), showed that morphological and histological changes of olfactory epithelium

were not linked to changes of OMP-positive number cells, before, during and after acetone exposure.

Pyridine ( $C_5H_5N$ ) is an organic, colorless liquid belonging to the heterocyclic amines widely used as a solvent and intermediate in the production of piperidine, agricultural chemicals, drugs, dyestuffs, paints, rubber products, polycarbonate resins and textile water-repellents, as well as in laboratory activities. Pyridine can also be formed from the breakdown of many natural materials in the environment. This volatile solvent has been identified in tobacco and cigarette smoke (Green and Rodgman, 1996; Baker and Bishop, 2004). Pyridine is adsorbed by inhalation, ingestion or cutaneous exposure (Reinhardt and Brittell, 1981). Concerning inhalation, toxicological studies in rodents have used lethal concentration (Smyth et al., 1951; Vernot et al., 1977) or subchronic exposures (Kristesashvili, 1965; Perov, 1973). Only one work (Nikula and Lewis, 1994) focused on the immunohistochemical effects on olfactory mucosa and showed epithelial lesions including vacuolar degeneration of sustentacular cells, loss of olfactory neurons and presence of intraepithelial luminal structures for pyridine concentrations ranged from 5 to 444 ppm.

As the effects of pyridine exposure on olfactory function in rodents are not well-described, this work was designed to compare sensitivity and olfactory neuroreceptors modifications during a short period/high concentration exposure and a long period/low concentration pyridine exposure. Pyridine was also chosen for this study because of its large production volume and its wide use in a variety of food, medical, and industrial products. Furthermore, inhalation is the primary route of exposure to pyridine (Reinhardt and Brittell, 1981). In order to clarify the potential toxic effects of pyridine on olfactory epithelium of mice, the present study used two complementary approaches. First, behavioral tests using corridor-shape maze were conducted in order to evaluate olfactory sensitivity. Second, immunohistochemical observations were carried out to provide information about the evolution of olfactory mature neurons and proliferative cells by using specific markers, respectively olfactory marker protein (OMP) and proliferating cell nuclear antigen (PCNA). OMP is expressed nearly exclusively in mature olfactory sensory cells (Farbman and Margolis, 1980; Margolis, 1982; Menco, 1989) and PCNA acts as an auxiliary protein to DNA polymerase delta.

## Materials and Methods

### 1- Animals

Experiments were conducted with 40 naive OF-1 female mice (Charles River, Paris, France), 3 month-old at the beginning of the study. Upon arrival at the animal facility, mice were leg-tattooed for identification purposes and acclimatized for 2 weeks prior to initiation of the study. Animals were housed in polycarbonate cages with stainless steel wire lids. Water and food were available *ad libitum*. Animals were maintained under a 12-h light/12-h dark cycle at 23-25°C under constant humidity. The study was carried out in accordance with the “Guide for the Care & Use of Laboratory Animals” (National Institute of Health, USA, 1985).

### 2 - Experimental design

A first experiment (short duration and high concentration of pyridine) was conducted with a group of 20 mice (named group 1) during 8 weeks divided in two periods: 4 weeks of pyridine exposure followed by 4 weeks of post-exposure period. A second experiment was conducted (long duration and low concentration of pyridine) with a group of 20 mice (named group 2) different from the group 1, during 5 months of pyridine exposure. In each group, 10 animals were used for the behavioral tests and 10 animals were used for immunohistochemical measurements.

### 3 - Pyridine exposure system

During the exposure periods, mice were placed in an inhalation chamber (long: 80 cm, wide: 42 cm, deep: 41 cm, volume = 0.13 m<sup>3</sup>) 5 hours per day (from 9 a.m. to 2 p.m.), 5 days per week (from Monday to Friday). In the inhalation chamber, mice were let in their cage with food and water *ad libitum*, so that animals did not have physical contact with pyridine. 1 mL for the first experiment and 15 µL for the second experiment of pure pyridine (C<sub>5</sub>H<sub>5</sub>N, molecular weight: 79.10, Sigma) were placed on a cotton in a glass into the inhalation chamber. Two silicone hoses (1 m length, 1 cm diameter) located into opposite sides of the inhalation chamber allowed passive ventilation during the pyridine exposure period.

### 4 - Gas chromatography analyses

Pyridine concentrations were measured in the inhalation chamber by gas chromatography using a Micro GC (Varian-CP 4900). Samples of chamber's air, taken at 1 hour intervals, were injected and analysed at constant temperature (160°C) and pressure (150 kPa) with helium as vector gas. As concentration was suspected to be

not homogeneous in the chamber's air, five complete tests of 5 hours were conducted in different points, at the same height corresponding to the presence of animals. Data were analysed with a standard of 100 ppm pyridine. For the first experiment (1 mL of pyridine) the mean concentration was 3600 ppm and for the second experiment (15  $\mu$ L of pyridine) the mean concentration was 50 ppm.

#### 5 - Behavioral experiments

Olfactory sensitivity was evaluated using a corridor-shape maze (60 cm in length, 7 cm in breadth, 7 cm in height). In both extremities, a watch-glass was placed with a filter paper with either 190  $\mu$ L of distilled water (no odorant area), and pyridine (diluted at 10%) or butanol (control odor, diluted at 10%) as odorant area. The odorant area was randomly distributed in the right and left arm at each test. After each test, corridor-shape maze was carefully washed with alcohol. Each mouse was placed at the middle of the corridor-shape maze and allowed to move freely for 3 minutes. Movements of mice were video recorded and analysed with Ethovision Noldus software, a video tracking system for automation of behavioral experiments. In the present study data collected concerned the total time spent by each mouse in each half part of the corridor. For the first experiment, data were recorded before pyridine exposure (W0), during the exposure period (W2 and W4) and during the post-exposure period (W6 and W8). For the second experiment, data were recorded before pyridine exposure (W0) and during the exposure period (W4, W8, W12, W16 and W20).

#### 6 - Immunohistochemistry

##### *Dissection and tissues preparation*

Two mice were sacrificed every two weeks for the first experiment (W0, W2, W4, W6 and W8) and every four weeks for the second experiment (W4, W8, W12, W16 and W20). Data collected before exposure (W0) in the first experiment, were used for comparison in the second experiment. Mice were injected intraperitoneally with 1 mL of chloral 3M. Five minutes later, they were killed by decapitation and the whole nasal cavity tissue was collected from the tip to the ending connexion with the olfactory bulb. Olfactory epithelium was removed and disconnected from the respiratory epithelium. Then, olfactory epithelium (as a one-piece intact tissue) was fixed by immersion in 4% paraformaldehyde in phosphate buffer saline (PBS1x) for 12 hours at 4°C. The fixed tissue was rinsed twice with PBS1x for 20 minutes and decalcified by immersion in decalcifying solution/medium (composition: 10% hydrochloric acid)

for 12 hours. Then, the tissue was rinsed twice with PBS1x for 20 minutes and embedded in paraffin, with respect to the initial orientation of the olfactory epithelium. Transverse serial sections of 10  $\mu\text{m}$  were cut on a microtome and placed on gelatine-coated slides.

The gelatine-coated slides were deparaffinized and re-hydrated. The slides were first rinsed in PBS1x, treated with 0,1% Triton X-100 during 30 min and rinsed again in PBS1x. Tissues were blocked for 10 min with 1% bovine serum albumin (BSA) and 30 min with vector mouse blocking reagent in PBS1x (used to block endogenous mouse antibody in the tissue section). Tissues were then incubated for 15h at 4°C under wet atmosphere with anti-olfactory marker protein (1:200, Wako Chemicals, Richmond, VA, USA) combined with anti-proliferating cell nuclear antigen (monoclonal antibody, 1:100, Chemicon International) in 1% BSA. The slides were rinsed with PBS1x and incubated with anti-goat secondary antibody (1:1000) and anti mouse secondary antibody (1:1000) for 2h at room temperature. The slides were rinsed again with PBS1x and mounted.

#### *Immunohistochemical measurements*

To evaluate the number of mature olfactory sensory cells, OMP-positive cells were counted for an area of 1 000  $\mu\text{m}^2$  in the main-body of OE. To observe cell proliferation in the OE, immunoreactivity to PCNA, a widely used marker for cell proliferation, was measured. PCNA-positive cells were quantified for a length of 500  $\mu\text{m}$  in the basal layer. Nine slides of each OE were used for counting.

#### *Image acquisition and processing*

The slides were examined and photographed using Olympus BX 51 microscope equipped with Olympus camera DP5 and Analysis software. All images were adjusted with Adobe Photoshop software for contrast and brightness to equilibrated light levels.

#### *7- Statistical analyses*

Data were analysed by analysis of variance (ANOVA) with repeated measures and *post hoc* were made with Scheffé tests, using Statview 5.0 statistical software. The data were expressed as means  $\pm$  standard errors. *P*-Values of less than 0.05 were considered significant. The non-significant analyses were noted as ns.

## Results

### 1- Behavioral measures of olfactory sensitivity

Results for the first experiment are reported in Fig. 1. The 5 (week) x 10 (animal) ANOVA showed a no significant effect of week factor concerning pyridine odor [ $F(4,36) = 1.66$ , ns] as well as butanol odor [ $F(4, 36) = 0.91$ , ns].

Results for the second experiment are reported in Fig. 2. The 6 (week) x 10 (animal) ANOVA showed no significant effect of week factor concerning pyridine odor [ $F(5,45) = 0.98$ , ns] as well as butanol odor [ $F(5, 45) = 1.22$ , ns].

### 2- Immunohistochemical evaluation

Results for the first experiment are reported in Fig. 3 & Fig. 4.

The 5 (week) x 18 (slide) ANOVA with repeated measures revealed a significant week effect on the number of OMP-positive cells [ $F(4,68) = 16.89$ ,  $p < 0.0001$ ] in the main-body olfactory epithelium. *Post hoc* Scheffé tests showed that the number of OMP-positive cells increased significantly during exposure (W2 and W4) and remained stable to the W4 level during the post-exposure period (W6 and W8).

The 5 (week) x 18 (slide) ANOVA with repeated measures revealed a significant week effect on the number of PCNA-positive cells [ $F(4,68) = 28.89$ ,  $p < 0.0001$ ] in the basal layer of olfactory epithelium. *Post hoc* Scheffé tests showed that the number of PCNA-positive cells decreased significantly at the middle of exposure period (W2) and remained stable to the W2 level at the end of exposure period (W4) as well as during the post-exposure period (W6 and W8).

Results for the second experiment are reported in Fig. 5 & Fig. 6.

The 6 (week) x (18 slide) ANOVA with repeated measures revealed a significant week effect on the number of OMP-positive cells [ $F(5,85) = 13.95$ ,  $p < 0.0001$ ] in the main-body olfactory epithelium. *Post hoc* Scheffé tests showed that the number of OMP-positive cells increased significantly at the beginning of exposure (W4) and remained stable until the end of exposure (W8, W12, W16 and W20) to a level slightly lower than W4 but strongly higher than the W0 level.

The 6 (week) x (18 slide) ANOVA with repeated measures revealed a significant week effect on the number of PCNA-positive cells [ $F(5,85) = 22.45$ ,  $p < 0.0001$ ] in the basal

layer of olfactory epithelium. *Post hoc* Scheffé tests showed that the number of PCNA-positive cells decreased significantly at the beginning of exposure period (W4) and remained stable to the W4 level until the end of exposure period (W8, W12, W16 and W20).

## Discussion

From a behavioral point of view, data showed that inhalation exposure to pyridine in a female mice group induced no significant modifications of sensitivity to pyridine and butanol whatever the concentration used and the time of exposure.

From an immunohistochemical point of view, data showed a similar evolution in the number of cells in both experiments. The OMP-positive cells quantified in the main-body of olfactory epithelium, increased strongly as early as the beginning of pyridine exposure in the same way for both experiments, independently of concentration and time of exposure, i.e. to reach a maximum at W4. This enhanced number was maintained five months without significant changes (second experiment). Interestingly, any decrease of OMP-positive cells was observed in the 4 weeks post-exposure period (first experiment). The PCNA-positive cells quantified in the basal layer, decreased strongly as early as the beginning of pyridine exposure, i.e. W2 in the first experiment and W4 in the second experiment. This low number was maintained five months without significant changes (second experiment). In the first experiment, the low number at W2 was maintained at W4 (end of exposure) as well as during the 4 weeks post-exposure period.

The findings indicated that pyridine inhalation exposure, whatever the concentration used and the time of exposure induced no damage on mature olfactory neurons, contrary to most solvent exposure studies. Rather than a loss, the present study observed a significant increased number of olfactory neuroreceptors according to behavioral sensitivity measurements which also appeared not altered. These results suggest that pyridine inhalation induces an enhancement of neurogenesis from local neuronal progenitors (Crews and Hunter, 1994). It is well known that olfactory neuroreceptors regenerate regularly along the lifespan as well after specific destruction such as intranasal ZnSO<sub>4</sub> treatment (Ducray et al., 2002). Intranasal perfusion of zinc sulfate leads to transient anosmia (McBride and Slotnick, 2003) and the cellular loss concerned principally the olfactory neuroreceptors due to necrosis and apoptosis

processes (Ducray et al., 2002) coupled with a reduction in the *c-fos* protein expression (Keller et al., 2006). In the case of pyridine inhalation, it can be hypothesized an increased neurogenic process without necrosis or apoptosis induction. In rats, the studies using pyridine exposure generally reported no histopathological changes in the olfactory epithelium (Smyth et al., 1951; Kristesashvili, 1965; Perov, 1973; Vernot et al., 1977), except the work of Nikula and Lewis (1994) which reported a loss of olfactory neurons following pyridine exposure. However, the results of the present study are in agreement with the same work of Nikula and Lewis (1994) concerning PCNA-positive cells. The decreased number of PCNA-positive cells indicated a reduction of the mitotic activity and not a cellular death of basal cells. These findings are in agreement with other studies such as those of Evans et al. (1995) after nickel exposure, but could appear inconsistent with the increased number of OMP-positive cells at the same time. It can be hypothesized that the PCNA-positive cells induced a *turnover* of OMP-positive cells at the early beginning of exposure (i.e. probably during W1, not investigated) corresponding to the increased number of mature olfactory neurons and logically a decreased number of basal cells in the second week of exposure period (i.e. W2, investigated). In addition, pyridine was quickly transformed into the nasal mucosa as suggested by the present study showing no dose-dependent effect. Specifically, pyridine is metabolized by cytochromes P450, 2E1 and 4B (Kim et al., 1990; 1991) and the levels of several isozymes of cytochromes P450 have been shown to increase in the nose (Reddy et al., 1992) - as well as in the liver (Hotchkiss et al., 1993) - after pyridine inhalation exposure including 1A1 and 1A2 in nasal tissues. In the present study, considering the lack of alteration in olfactory sensitivity and similar cellular dynamics whatever the amount and duration of exposure, it can be hypothesized that pyridine has an effect on cell pathways leading to a rapid cell cycle induction. Hence, it would be relevant to investigate kinase pathways leading to the activities of proteins involved in the cell cycle regulation into olfactory epithelium (Legrier et al., 2001) in the first hours after pyridine inhalation. However, considering that pyridine could be rapidly metabolized by cytochrome activity, the derivative compounds could be secondarily lead to cell disruption such as cell cycle inhibition as already shown (Franzén et al., 2006).

The opposite evolution observed for OMP- and PCNA-positive cells during the first four weeks of experiment, would confirm the possibility - insofar as after ZnSO<sub>4</sub> nasal treatment - that the neuroepithelium is able to achieve a total recovery in four weeks.

In order to clarify the cell signalling that lead to neurogenesis of olfactory epithelium after chemical inhalation, it would be relevant in further research to focus on the regulation of trophic factors such as retinoic acid, FGF, TGF or PGF in basal cells (Asson-Batres, 2003; Newman et al., 2000).

Several published experiments have been focused on the histopathological changes in the rodent olfactory epithelium after inhalation of chemicals (Gaskell, 1990; Renne et al., 2007) associated with changes in the smell abilities. Among chemicals, the findings based on solvent exposures frequently resulted in toxicity of nasal olfactory cells, e.g. styrene (Cruzan et al., 2001; 2002), chloroform (Larson et al., 1994; Kasai et al., 2002), furfuryl alcohol (Irwin et al., 1997) or dibasic esters (Hardisty et al., 1999) and ultrastructural changes of olfactory epithelium, number of cells and thickness, e.g. toluene (Jacquot et al., 2006) or acetone (Buron et al., 2008). However, few studies have investigated more than one cell phenotype in the same exposure experiment. For instance, studies conducted with ethanol, isobutyraldehyde or styrene have revealed that the mature neurons were the main cell type affected by apoptosis (Vent et al., 2004) or necrosis (Cruzan et al., 2001) processes. In contrast, it has been recently shown that the number of OMP-positive cells remained stable during acetone exposure, showing no effect on mature olfactory neurons (Buron et al., 2008) although the number of PCNA-positive cells decreased as early as the beginning of exposure. From a functional point of view, solvents owing to their lipophilicity, can readily cross the nasal mucosa and enter underlying cellular membranes (Doty and Hastings, 2001), especially in the *lamina propria*. For instance, Uraih et al. (1987) showed that the Bowman's glands located in the *lamina propria* were critical for an efficient and complete regeneration of the olfactory epithelium in animals exposed to toxic substances affecting the olfactory system. Nevertheless, it has been shown that the Bowman's glands can degenerate following toxic exposure such as benzene inhalation (Brittebo et al., 1990). In the same way, future research could determine the role of sustentacular cells in the processes of degeneration or regeneration following solvent exposure in nasal tissue (Pixley et al., 1997).

## References

- Aoki A., Suzuki H., Kawabata Y., Nomura Y. (1994) Effect of perchloroethylene inhalation on nasal mucosa in mice. *European Archives of Otorhinolaryngology*, 251: 361-365.
- Asson-Batres M.A, Ahmad O., Smith W.B. (2003) Expression of the cellular retinoic acid binding proteins, type II and type I, in mature rat olfactory epithelium. *Cell Tissue Research*, 312: 9-19.
- Baker R.R., Bishop L.J. (2004) The pyrolysis of tobacco ingredients. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, 71: 223-311.
- Bogdanffy M.S., Glanick N.L., Kegelman T., Frame S.R. (1997) Four-week inhalation cell proliferation study of the effects of vinyl acetate on rat nasal epithelium. *Inhalation Toxicology*, 9: 331-350.
- Brittebo E.V., Eriksson C., Brandt I. (1990) Activation and toxicity of bromobenzene in nasal tissue in mice. *Archives of Toxicology*, 64: 54-60.
- Buck L., Axel R. (1991) A novel multigene family may encode odorant receptors: a molecular basis for odor recognition. *Cell*, 65: 175-187.
- Buck L.B. (2000) The molecular architecture of odor and pheromone sensing in mammals. *Cell*, 100: 611-618.
- Burd GD. (1993) Morphological study of the effects of intranasal zinc sulfate irrigation on the mouse olfactory epithelium and olfactory bulb. *Microscopy Research and Technique*, 24, 195-213.
- Buron G, Hacquemand R, Pourié G, Brand G. (2008) Inhalation exposure to acetone induces selective damage on olfactory neuroepithelium in mice. *Neurotoxicology (in press)*
- Carr V.M., Farbman A.I., Colletti L.M., Morgan J.I. (1991) Identification of a new non-neuronal cell type in rat olfactory epithelium. *Neuroscience*, 45: 433-449.
- Carter LA, MacDonad JL, Roskams AJ. (2004) Olfactory horizontal basal cells demonstrate a conserved multipotent progenitor phenotype. *Journal of Neuroscience*, 23: 5670-5683.
- Crews L., Hunter D. (1994) Neurogenesis in the olfactory neuroepithelium. *Perspectives and Developmental Neurobiology*, 2, 151-161.
- Cruzan G., Cushman J.R., Andrews L.S., Granville G.C., Johnson K.A., Bevan C., Hardy C.J., Coombs D.W., Mullins P.A., Brown W.R. (2001) Chronic toxicity/oncogenicity study of styrene in CD-1 mice by inhalation exposure for 104 weeks. *Journal of Applied Toxicology*, 21: 185-198.

Cruzan G., Carlson G.P., Johnson K.A., Andrews L.S., Banton M.I., Bevan C., Cushman J.R. (2002) Styrene respiratory tract toxicity and mouse lung tumors are mediated by CYP2F-generated metabolites. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 35: 308-319.

Doty R.L., Hastings L. (2001) Neurtoxic exposure exposure and olfactory impairment. *Clinical Occupational and Environmental Medicine*, 1: 547-575.

Ducray A, Bondier JR, Michel G, Bon K, Millot JL, Propper A, Kastner A. (2002) Recovery following peripheral destruction of olfactory neurons in young and adult mice. *European Journal of Neurosciences*, 15: 1907-1917.

Evans J.E., Miller M.L., Andringa A., Hastings L. (1995) Behavioral, histological and neurochemical effects of nickel (II) on the rat olfactory system. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 130: 209-220.

Farbman A.I. (1990) Olfactory neurogenesis: genetic or environmental controls? *Trends in Neurosciences*, 13: 362-365.

Farbman A.I, Margolis F.L. (1980) Olfactory marker protein during ontogeny: immunohistochemical localization. *Developmental Biology*, 74: 205-215.

Franzén A., Carlsson C., Hermansson V., Lang M., Brittebo E.B. (2006) CYP2A5-mediated activation and early ultrastructural changes in the olfactory mucosa: studies on 2,6-dichlorophenyl methylsulfone. *Drug Metabolism and Disposition*, 34: 61-68.

Gaskell B.A. (1990) Nonneoplastic changes in the olfactory epithelium – Experimental studies. *Environmental Health Perspectives*, 85: 275-279.

Giannetti N, Moyse E, Ducray A, Bondier JR, Jourdan F, Propper A, Kastner A. (2004) Accumulation of Ym1/2 protein in the mouse olfactory epithelium during regeneration and aging. *Neuroscience*, 123: 907-917.

Gobba F. (2003) Occupational exposure to chemicals and sensory organs: a neglected research field. *Neurotoxicology*, 24: 675-691.

Green C.R., Rodgman A. (1996) The Tobacco Chemists' Research Conference; A half-century of advances in analytical methodology of tobacco and its products. *Recent Advances in Tobacco Science*, 22: 131–304.

Gross E.A., Mellick P.W., Kari F.W., Miller F.J., Morgan K.T. (1994) Histopathology and cell replication responses in the respiratory tract of rats and mice exposed by inhalation to glutaraldehyde four up to 13 weeks. *Fundamental and Applied Toxicology*, 23: 348-362.

Hardisty J.F., Garman R.H., Harkema J.R., Lomax L.G., Morgan K.T. (1999) Histopathology of nasal olfactory mucosa from selected inhalation toxicity studies conducted with volatile chemicals. *Toxicologic Pathology*, 27: 618-627.

Herzog C., Otto T. (1999) Regeneration of olfactory receptor neurons following chemical lesion: time course and enhancement with growth factor administration. *Brain Research*, 849: 155-161.

Holbrook E.H., Szumowski K.E., Schwob J.E. (1995) An immunochemical, ultrastructural, and developmental characterization of the horizontal basal cells of rat olfactory epithelium. *Journal of Comparative Neurology*, 363: 129-146.

Hotchkiss J.A., Kim S.G., Novak R.F., Dahl A.R. (1993) Enhanced hepatic expression of P450IIE1 following inhalation exposure to pyridine. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 118: 98-104.

Irwin R.D., Chou B.J., Mellick P.W., Miller R.A., Mahler J., Roycroft J. (1997) Toxicity of furfuryl alcohol to F344 rats and B6C3F1 mice exposed by inhalation. *Journal of Applied Toxicology*, 17: 159-169.

Jacquot L., Pourie G., Buron G., Monnin J. Brand G. (2006) Effects of toluene inhalation exposure on olfactory functioning: behavioral and histological assessment. *Toxicology Letters*, 165: 57-65.

Kasai T., Nishizawa T., Arito H., Nagano K., Yamamoto S., Matsushima T., Kawamoto T. (2002) Acute and subchronic inhalation toxicity of chloroform in rats and mice. *Journal of Occupational Health*, 44: 193-202.

Keller M., Douhard Q., Baum M.J., Bakker J. (2006) Sexual experience does not compensate for the disruptive effects of zinc sulphate-lesioning of the main olfactory epithelium on sexual behaviour in male mice. *Chemical Senses*, 31: 753-762.

Kim S.G., Reddy S.L., States J.C., Novak R.F. (1991) Pyridine effects on expression and molecular regulation of the cytochrome P450IA gene family. *Molecular Pharmacology*, 40: 52-57.

Kim S.G., Williams D.E., Schuetz E.G., Guzelian P.S., Novak R.F. (1990) Pyridine induction of cytochrome P450 in the rat: role of P450 (alcohol-inducible form) in pyridine N-oxidation. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 246: 1175-1182.

Kristesashvili T.S. (1965) Data to substantiate the maximal permissible concentration of pyridine in the atmosphere. *Higiiena i Sanitriia*, 30: 173-177.

Larson J.L., Wolf D.C., Morgan K.T., Méry S., Butterworth B.E. (1994) The toxicity of 1-week exposures to inhaled chloroform in female B6C3F1 mice and male F-344 rats. *Fundamental and Applied Toxicology*, 22: 431-446.

Legrier M.E., Ducray A., Propper A., Chao M., Kastner A. (2001) Cell cycle regulation during mouse olfactory neurogenesis. *Cell Growth and Differentiation*, 12: 591-601.

Lomax L.G., Krivanek N.D., Frame S.R. (1997) Chronic inhalation toxicity and oncogenicity of methyl methacrylate in rats and hamsters. *Food and Chemical Toxicology*, 35: 393-407.

Margolis F.L. (1982) Olfactory marker protein (OMP). *Scandinavian Journal of Immunology*, 9: 181-199.

McBride K., Slotnick B., Margolis F.L. (2003) Does intranasal perfusion of zinc sulfate produce anosmia in mouse? An olfactometric and anatomical study. *Chemical Senses*, 28: 659-670.

Menco B.P. (1989) Electron-microscopic demonstration of olfactory-marker protein with protein G-gold in freeze-substituted, Lowicryl K11M-embedded rat olfactory-receptor cells. *Cell Tissue Research*, 256: 275-281.

Monticello T.M., Morgan K.T., Uraih L. (1990) Nonneoplastic nasal lesions in rats and mice. *Environmental Health Perspectives*, 85: 249-274.

Newman M.P., Feron F., Mackay-Sim A. (2000) Growth factor regulation of neurogenesis in adult olfactory epithelium. *Neuroscience*, 99: 343-350.

Nikula K.J., Lewis J.L. (1994) Olfactory mucosal lesions in F344 rats following inhalation exposure to pyridine at threshold limit value concentrations. *Fundamental and Applied Toxicology*, 23: 510-517.

Perov O.V. (1973) Effects of inhalation of subchronic doses of pyridine on the state of surfactant in the lung alveoli and on lipid formation of the pneumocytes. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 76: 766-769.

Pixley S.K., Farbman A.I., Menco B.P. (1997) Monoclonal antibody marker for olfactory sustentacular cell microvilli. *Anatomical Record*, 248: 307-321.

Reddy S.L., Hotchkiss J.A., Dahl A.R., Novak R.F. (1992) RT-PCR distribution of CYP1A1 and 1A2 expression in control and pyridine (PY) exposed rat nasal tissue. *Toxicologist*, 12:139.

Reinhardt C.F., Brittell M.R. (1981) Heterocyclic and miscellaneous nitrogen compounds. In *Patty's Industrial Hygiene and Toxicology* (G.D. Clayton and F.E. Clayton Eds.), 3<sup>rd</sup> ed., pp 2727-2731. Wiley-Interscience, New-York.

Renne R.A., Gideon K.M., Harbo S.J., Staska L.M., Grumbein S.L. (2007) Upper respiratory tract lesions in inhalation toxicology. *Toxicologic Pathology*, 35: 163-169.

Schwartz B.S., Doty R.L., Monroe C., Frye R., Baker S. (1989) Olfactory function in chemical workers exposed to acrylate and methacrylate vapors. *American Journal of Public Health*, 79: 613-618.

Schwartz B.S., Ford D.P., Bolla K.I., Agnew J., Rothman N., Bleecker M.L. (1990) Solvent-associated decrements in olfactory function in paint manufacturing workers. *American Journal of Industrial Medicine*, 18: 697-706.

Smyth H.F., Carpenter C.P., Weil C.S. (1951) Range findings toxicity data list IV. American Medical Association Archives of Industrial Health, 4: 119.

Uraih L.C., Talley F.A., Mitsumori K., Gupta B.N., Bucher J.R., Boorman G.A. (1987) Ultrastructural changes in the nasal mucosa of Fischer 344 rats and B6C3F1 mice following an acute exposure to methyl isocyanate. Environmental Health Perspectives, 72: 77-88.

Vent J., Robinson A.M., Gentry-Nielsen M.J., Conley D.B., Hallworth R., Leopold D.A., Kern R.C. (2004) Pathology of the olfactory epithelium: smoking and ethanol exposure. Laryngoscope, 114: 1383-1388.

Vernot E.H., MacEwen J.D., Haun C.C., Kinkead E.R. (1977) Acute toxicity and skin corrosion data for some organic and inorganic compounds and aqueous substances. Toxicology and Applied Pharmacology, 42: 417-423.

For Peer Review

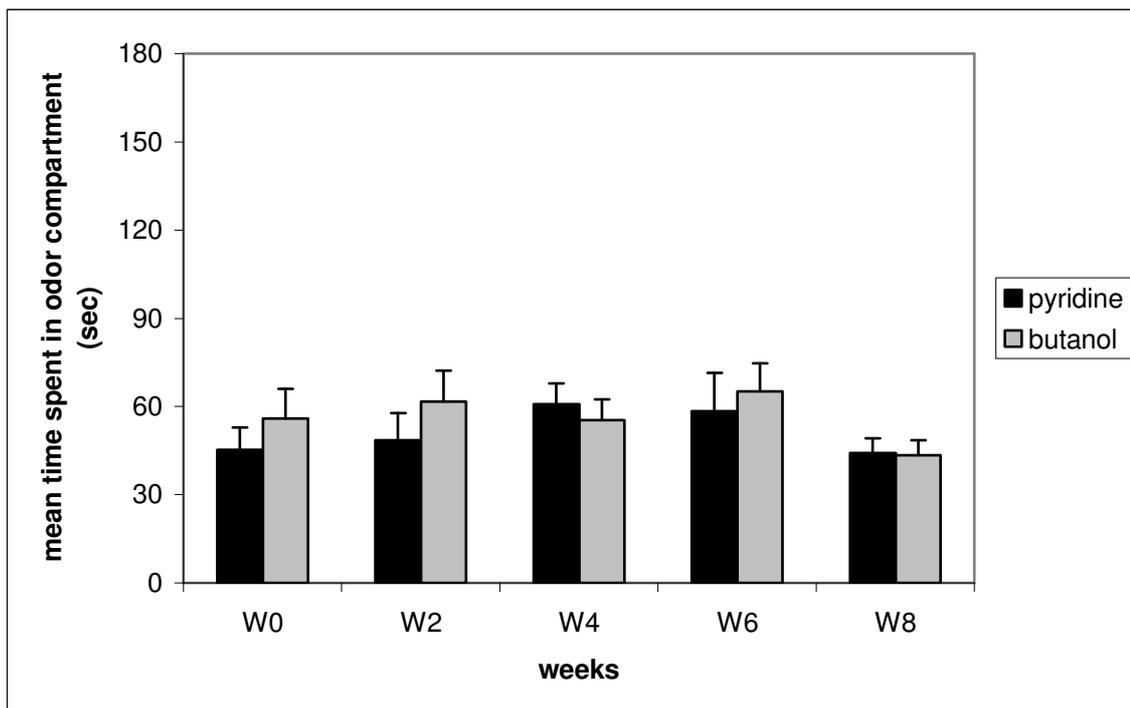


Fig. 1. Behavioral sensitivity to pyridine and butanol odors evaluated in corridor-maze divided in two compartments (odor and water). Evolution of the mean time spent by mice (N=10) before (W0), during (W2, W4) and after (W6, W8) a 5h/day – 5 days/week pyridine exposure. No significant week effect.

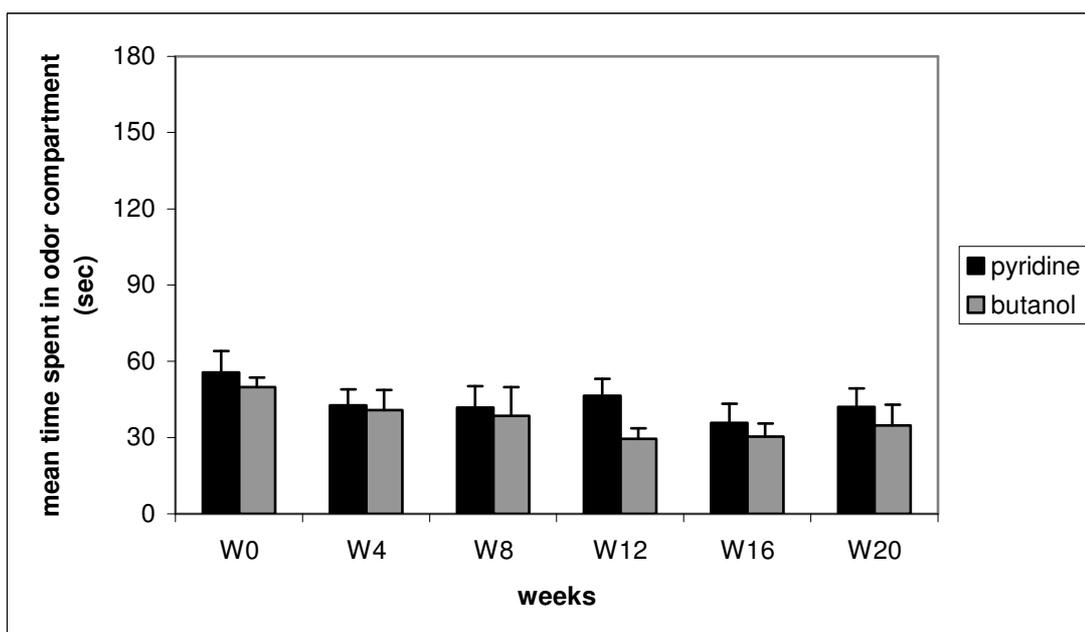


Fig. 2. Behavioral sensitivity to pyridine and butanol odors evaluated in corridor-maze divided in two compartments (odor and water). Evolution of the mean time spent by mice (N=10) before (W0) and during (W4, W8, W12, W16, W20) a 5h/day – 5 days/week pyridine exposure. No significant week effect.

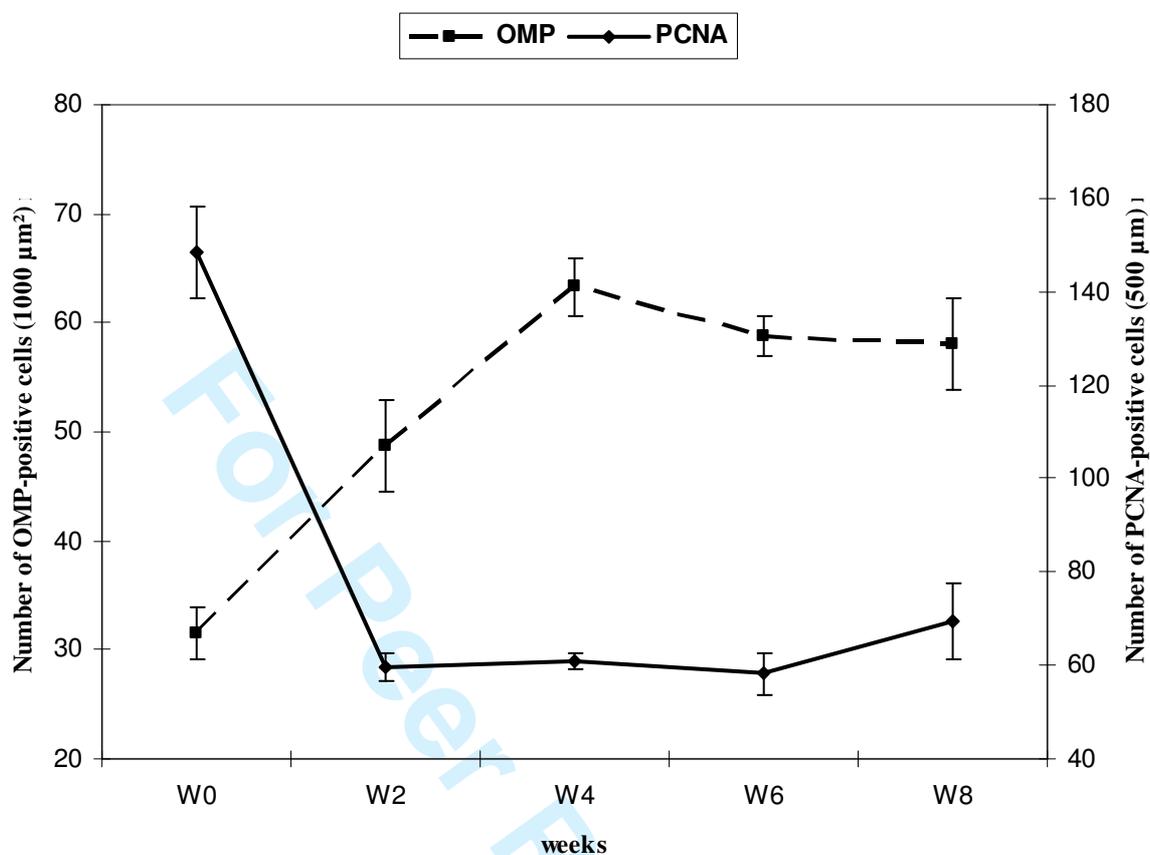


Fig. 3. Evolution of the number of OMP-positive cells in whole body and PCNA-positive cells in the basal layer of olfactory epithelium before (W0), during (W2, W4) and after (W6, W8) a 5h/day – 5 days/week pyridine exposure.

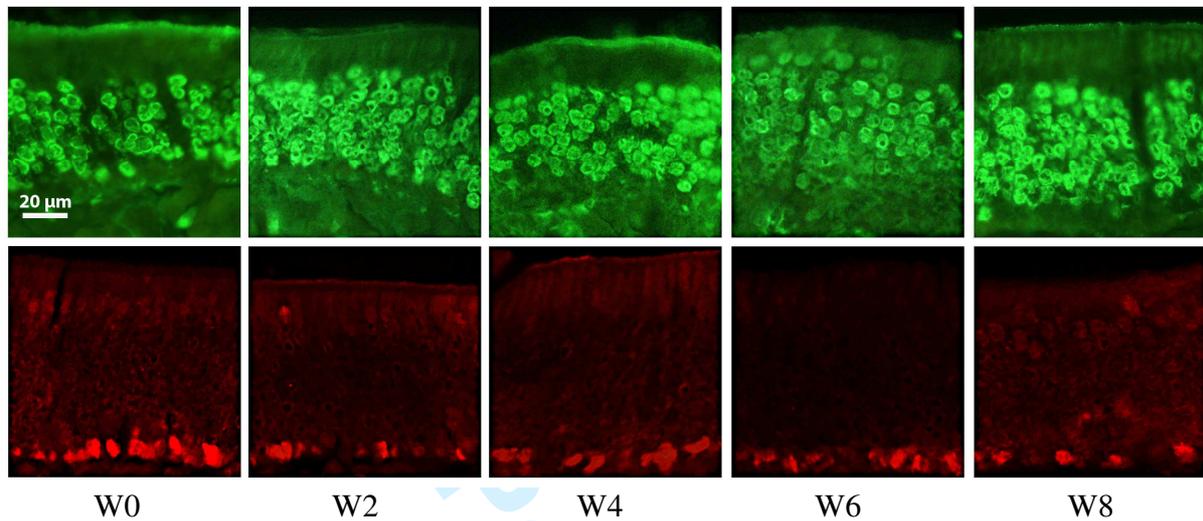


Fig. 4. Olfactory epithelium : Immunohistochemical illustration of OMP- (quantified in the main-body) and PCNA- (quantified in the basal layer) positive cells evolution before (W0) during (W2, W4) and after (W6, W8) pyridine inhalation exposure

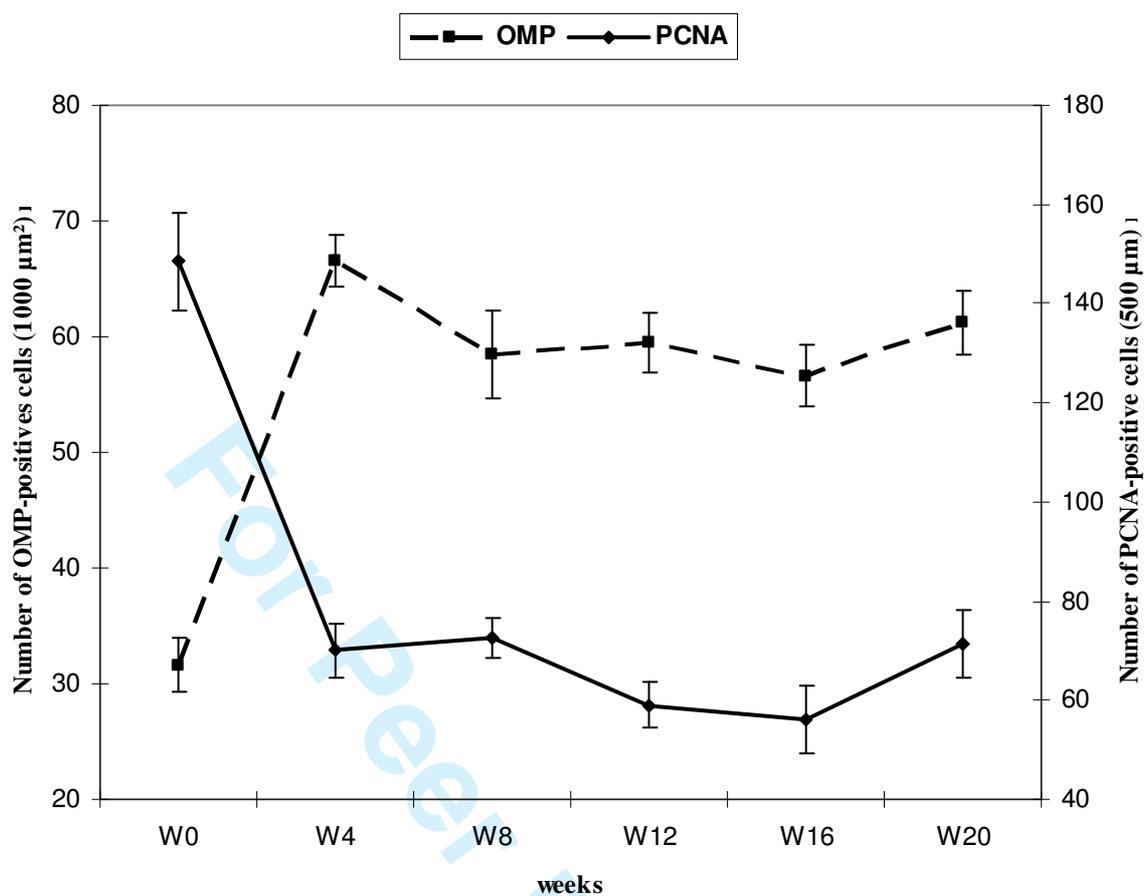


Fig. 5. Evolution of the number of OMP-positive cells in whole body and PCNA-positive cells in the basal layer of olfactory epithelium before (W0) and during (W4, W8, W12, W16 and W20) a 5h/day – 5 days/week pyridine exposure.

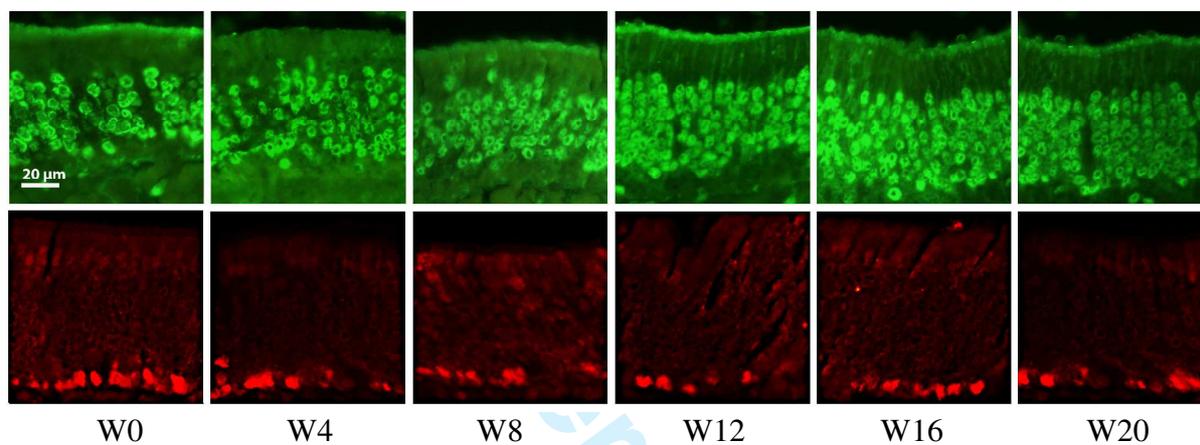


Fig. 6. Olfactory epithelium : Immunohistochemical illustration of OMP- (quantified in the main-body) and PCNA- (quantified in the basal layer) positive cells evolution before (W0) and during (W4, W8, W12, W16, W20) pyridine inhalation exposure

## **ANNEXE 4**

# Comparative Behavioral Effects Between Synthetic 2,4,5-trimethylthiazoline (TMT) and the Odor of Natural Fox (*Vulpes vulpes*) Feces in Mice

Gaelle Buron, Romain Hacquemand, Gregory Pourie, Annie Lucarz, Laurence Jacquot, and Gerard Brand  
Université de Franche-Comté

Synthetic 2,4,5-trimethylthiazoline (TMT)—a component of red fox (*Vulpes vulpes*) feces—is frequently used to induce unconditioned fear in rodents. Surprisingly, direct comparison between TMT and natural fox feces odor is almost nonexistent. In this study, Experiment 1 compared the avoidance in relation to TMT concentration, natural fox feces, and gender of fox and mice. Results show that the avoidance is (a) higher with either pure or 50% TMT as compared to natural fox feces, whereas the difference is slight with 10% TMT, and (b) significantly higher for the female mouse group compared to the male mouse group with TMT as well as natural fox feces. In addition, no clear difference in effect was observed between male and female fox feces. Experiment 2 compared behavioral parameters recorded as an index of fear and anxiety, general activity, and avoidance in elevated plus-maze and open-field chamber between 10% TMT and natural fox feces in relation to the estrus cycle of the mice. Results show no cycle period effect—except for the avoidance parameter “distance to odorant”—and no different effects between 10% TMT and natural fox feces except for freezing.

*Keywords:* TMT, fear, olfactory sensitivity, avoidance, fox odor

Fear is a neurobehavioral response induced by several threatening stimuli and constitutes an important adaptive system in a majority of animal species. Fear can be derived from two different mechanisms, the *conditioned* (learned) or *unconditioned* (unlearned) fear (Rosen, 2004). While a number of studies have detailed the neural basis of conditioned fear, the processes involved in unconditioned fear are not entirely understood (Fendt & Fanselow, 1999). Current knowledge of the neurobiological processes of unconditioned fear is largely based on electric foot-shock stimuli. Alternatively, in a large variety of animal species, the detection of predators is mainly realized by the sense of smell, and predator odors appear to be relevant signals (especially for macrosmatic species such as rodents) to elicit innate fearful behavioral and physiological responses (Kats & Dill, 1998), in addition to classical electric foot-shock. Over the last decade, a variety of experimental studies have used synthetic 2,4,5-trimethylthiazoline (TMT) as a component of red fox odors to induce unconditioned fear in rodents (Fendt, Endres, Lowry, Apfelbach, & McGregor, 2005).

TMT is a volatile molecule naturally produced by the anal gland secretions of the red fox and subsequently present in the feces of

this species (Vernet-Maury, 1980). Synthetic TMT is known to induce a number of behavioral and physiological responses in rodents (Vernet-Maury, Polak, & Demael, 1984). Specifically, it has been shown that TMT elicits fear behaviors, such as freezing behavior, an immobility state in which all movements cease except those necessary for breathing (Fendt, Endres, & Apfelbach, 2003; Hotsenpiller & Williams, 1997), defensive burying (Holmes & Galea, 2002), and avoidance reactions (Burwash, Tobin, Woolhouse, & Sullivan, 1998b). Moreover, TMT exposure enhances the risk assessment behavior (Hebb et al., 2004), elicits endocrinal modifications (Belzung, Elhage, Moindrot, & Griebel, 2001; Day, Masini, & Campeau, 2004; Morrow, Elsworth, & Roth, 2002; Morrow, Redmond, Roth, & Elsworth, 2000), reduces eating behaviors (Burwash et al., 1998b), and increases the startle response (Hebb, Zacharko, Gauthier, & Drolet, 2003) in rodents.

However, as recently noted by Fendt et al. (2005), several questions are unresolved in the use of TMT, and it is not definitively known whether TMT is a specific-predatory cue or a noxious stimulus. Some studies have compared TMT-induced and natural predator odor-induced effects. These comparisons principally concerned TMT versus cat odor (Dielenberg & McGregor, 2001), which was collected by rubbing the cat or using a collar worn over a long period of time around the cat neck. The findings specifically failed to observe TMT-induced fear responses, such as freezing (McGregor, Schrama, Ambermoon, & Dielenberg, 2002; Morrow et al., 2002) or anxiety-like behavior in the elevated plus-maze (McGregor et al., 2002; Zangrossi & File, 1992), contrary to natural cat odor. Moreover, studies comparing the defensive behaviors induced by the odor of a live cat or cat fur or skin odor indicated consistent agreement in a wide variety of defensive-related assessments (Blanchard, Griebel, & Blanchard, 2003).

---

Gaelle Buron, Romain Hacquemand, Gregory Pourie, Annie Lucarz, Laurence Jacquot, and Gerard Brand, Laboratoire de Neurosciences, Université de Franche-Comté, Besançon, France.

We thank Jacques Barrat (Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments, Nancy, France) for providing the fox feces. We thank Alain Propper for careful reading of the article and constructive comments.

Correspondence concerning this article should be addressed to Gerard Brand, Laboratoire de Neurosciences, Université de Franche-Comté, Place Leclerc 25000, Besançon, France. E-mail: gerard.brand@univ-fcomte.fr

However, similar studies using TMT were less consistent; some investigations showed both positive and negative findings for some particular behavioral effects, whereas others did not reveal any TMT effect on the majority of the measures. Finally, TMT consistently elicited avoidance.

While odor-induced fear behavior arouses increasing attention, few studies have been devoted to the direct comparison between synthetic TMT and the odor of natural fox feces from which it is derived. Indeed, some studies have shown that the behavioral response is dose-dependent (Endres, Apfelbach, & Fendt, 2005; Takahashi, Nakashima, Hong, & Watanabe, 2005) and that the avoidance level influenced the anxiety-like responses in the same manner as the increased intensities of electric foot-shocks did. To address the issue of whether TMT induces specific avoidance, researchers have directly compared TMT to the odor of natural fox feces. Moreover, because the predator odor is produced by anal glands, it can be hypothesized that there is a possible difference in relation to the sex of the odor donor. Actually, it is known that anal gland secretions are qualitatively and quantitatively different between male and female, especially in predator species (Zhang et al., 2005).

Another question arising when fear and anxiety are tested is whether physiological or behavioral responses can be influenced by ovarian cycles in females (Marcondes, Miguel, Melo, & Spadari-Bratfisch, 2001). For a long time, it has been shown that olfactory sensitivity is modulated by the reproductive state (Schmidt & Schmidt, 1980). In addition, situations generating stress in mice attenuate a number of behaviors during diestrus, whereas no effect is observed during estrus (Gao & Cutler, 1993); anxiolytic drugs contribute to a reduction in this difference.

In the present work, the first experiment studied comparative avoidance effects in relation to TMT concentration, sex of mouse, and sex of fox in a preference–avoidance occupational zone test. A second experiment compared behavioral effects (stress, general activity, and avoidance) of 10% TMT and the odor of natural fox feces in relation to the ovarian cycle.

## Experiment 1

### *Materials and Methods*

#### *Subjects*

Subjects were 20 (10 male, 10 female) adult OF-1 mice (Charles River, Paris, France). Upon arrival at the animal facility, mice were leg-tattooed for identification purposes and acclimatized for 2 weeks prior to initiation of the study. Mice were maintained under a 12-hr light–dark cycle (testing conducted during the light phase) at 23–25 °C under constant humidity; food and water were available ad libitum.

#### *Odorants*

TMT was obtained from Acros Organics (Brussels, Belgium). Dilutions (50% and 10%) were prepared with deionized water. Red fox (*Vulpes vulpes*) feces were provided by fox farming (Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments, Atton Station, Nancy, France). Foxes were fed only dry dog food (Royal Canin SA, Paris, France). Feces of male and female (anestrus period) adults were taken within 10 hr after defecation.

### *Behavioral Tests*

We evaluated olfactory response to odorant using a corridor maze (60 cm in length, 7 cm in breadth, 7 cm in height). Both ends of the corridor contained a watch glass with a filter paper soaked with either 5  $\mu$ l of TMT (pure, diluted at 50% or 10%), or distilled water (control space), or 3 g of fox feces. TMT odor, water, and feces were randomly distributed in the right and left side at each test, as well as in the order of testing. The corridor was carefully washed with alcohol and dried between each animal passage. Each mouse was placed at the middle of the corridor and then allowed to move freely for 3 min. At each end of the corridor, a hydraulic exhaust fan (2 L/min air) prevented the diffusion of odors beyond the middle of the corridor.

Each test of 3 min (a short period to avoid habituation) was conducted twice at different moments (1 hr separating the blocks). Test–retest analyses showed no statistically significant differences in any case, so data were considered for 6 min. The movements of the mice were video recorded and analyzed with the EthoVision video tracking system for automation of behavioral experiments (Noldus, Wageningen, the Netherlands). Data collected concerned the total time spent by each mouse in each half of the corridor. We statistically evaluated data using paired Student *t*-tests and analysis of variance (ANOVA). We conducted post hoc analyses following significant ANOVA effects using Scheffé tests.

## *Results*

### *TMT Versus Water*

Results are reported in Figures 1A and 1B. Mice significantly avoided the TMT zone compared to the water zone whatever concentration was used, pure (312 s vs. 48 s;  $t(38) = 23.03$ ,  $p < .0001$ ), 50% diluted (296 s vs. 64 s;  $t(38) = 12.094$ ,  $p < .0001$ ), and 10% diluted (227 s vs. 133 s;  $t(38) = 4.58$ ,  $p < .0002$ ). A 3 (concentration)  $\times$  2 (sex) ANOVA revealed a significant effect of each variable, that is, concentration,  $F(2, 38) = 48.93$ ,  $p < .0001$ , and sex,  $F(1, 19) = 5.15$ ,  $p < .03$ . No significant interaction was observed between the variables,  $F(2, 38) = 0.366$ , *ns*.

Concerning gender effect, the avoidance of TMT was significantly higher for the female compared to the male mouse group. Concerning concentration effect, post hoc Scheffé tests did not show any difference between pure and 50% TMT,  $F(18) = 0.886$ , *ns*. In contrast, the avoidance was significantly higher for pure TMT versus 10% TMT,  $F(18) = 26.336$ ,  $p < .05$ , and for 50% TMT versus 10% TMT,  $F(18) = 17.561$ ,  $p < .05$ . It appeared that 10% TMT was a less repulsive condition than both pure and 50% TMT, which induced no significantly different avoidance.

### *Feces Versus Water*

Results are reported in Figures 2A and 2B. Mice avoided the feces zone compared to the water zone containing either male, 115 s vs. 245 s,  $t(38) = 3.98$ ,  $p < .0008$ , or female fox feces 106 s vs. 254 s,  $t(38) = 4.95$ ,  $p < .0001$ . A 2 (mouse sex)  $\times$  2 (fox sex) ANOVA indicated a mouse sex effect,  $F(1, 19) = 34.319$ ,  $p < .0001$ , and no fox sex effect,  $F(1, 19) = 0.371$ , *ns*. No significant interaction was observed between both variables,  $F(1, 19) = 0.507$ , *ns*. The female mouse group presented an

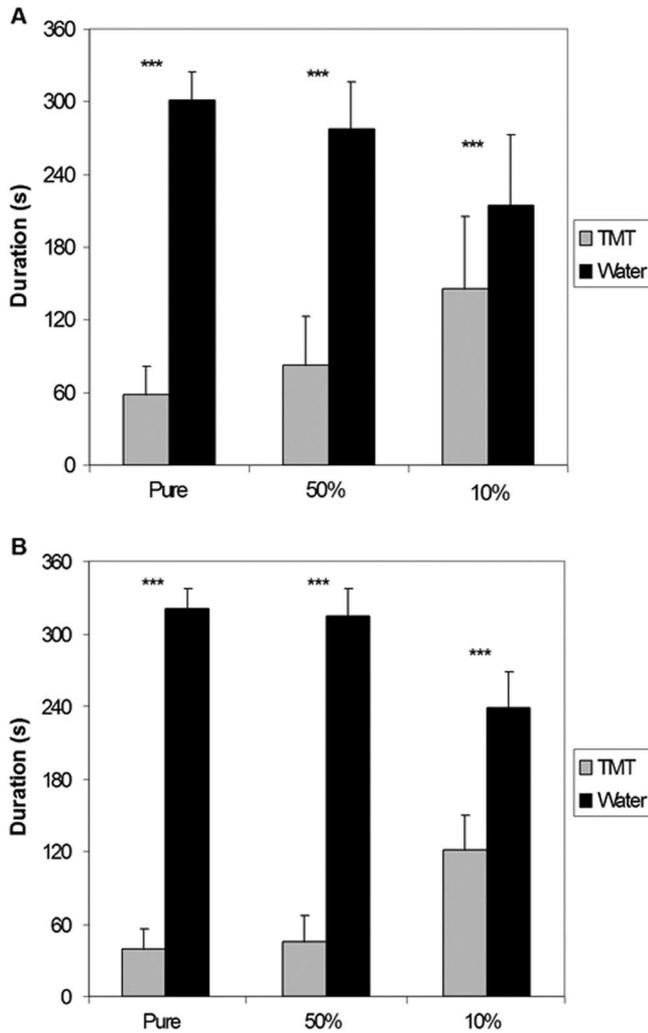


Figure 1. Comparison between occupation of 2,4,5-trimethylthiazoline (TMT) and water zones for male (A) and female (B) mouse groups.  $n = 10$  for each group. \*\*\* $p < .0001$ . Error bars indicate the standard error of the mean.

important avoidance of feces zones, whereas no difference between feces zone and water zone occupation appeared in the male mouse group.

*TMT Versus Male Feces*

Results are reported in Figures 3A and 3B. Mice significantly avoided the TMT zone compared to the male feces zone whatever the concentration used: pure, 302 s vs. 58 s,  $t(38) = 15.23$ ,  $p < .0001$ ; 50%, 299 s vs. 61 s,  $t(38) = 21.36$ ,  $p < .0001$ ; and 10% diluted, 245 s vs. 115 s,  $t = 6.51$ ,  $p < .0001$ . A 3 (concentration)  $\times$  2 (sex) ANOVA revealed a significant effect of each factor, that is, concentration,  $F(2, 38) = 16.36$ ,  $p < .0001$ , and sex,  $F(1, 19) = 25.019$ ,  $p < .0001$ . No significant interaction was observed between the variables,  $F(2, 38) = 0.188$ ,  $ns$ .

Concerning gender effect, the avoidance of TMT was significantly higher for the female compared to the male mouse group. Concerning concentration effect, post hoc Scheffé tests showed that no difference was observed between pure TMT and 50% TMT,  $F(18) = 0.039$ ,  $ns$ . In contrast, the avoidance was significantly higher for pure TMT versus 10% TMT,  $F(18) = 13.629$ ,  $p < .05$ ; and for 50% TMT versus 10% TMT,  $F(18) = 12.215$ ,  $p < .05$ . It appeared that 10% TMT was a less repulsive condition than both pure TMT and 50% TMT, which induced no significantly different avoidance.

*TMT Versus Female Feces*

Results are reported in Figures 4A and 4B. Mice significantly avoided the TMT zone compared to the female feces zone whatever the concentration used: pure, 323 s versus 37 s,  $t(38) = 30.92$ ,  $p < .0001$ ; 50%, 310 s vs. 50 s,  $t(38) = 14.95$ ,  $p < .0001$ ; and 10% diluted, 275 s vs. 85 s,  $t(38) = 9.89$ ,  $p < .0001$ . A 3 (concentration)  $\times$  2 (sex) ANOVA revealed a

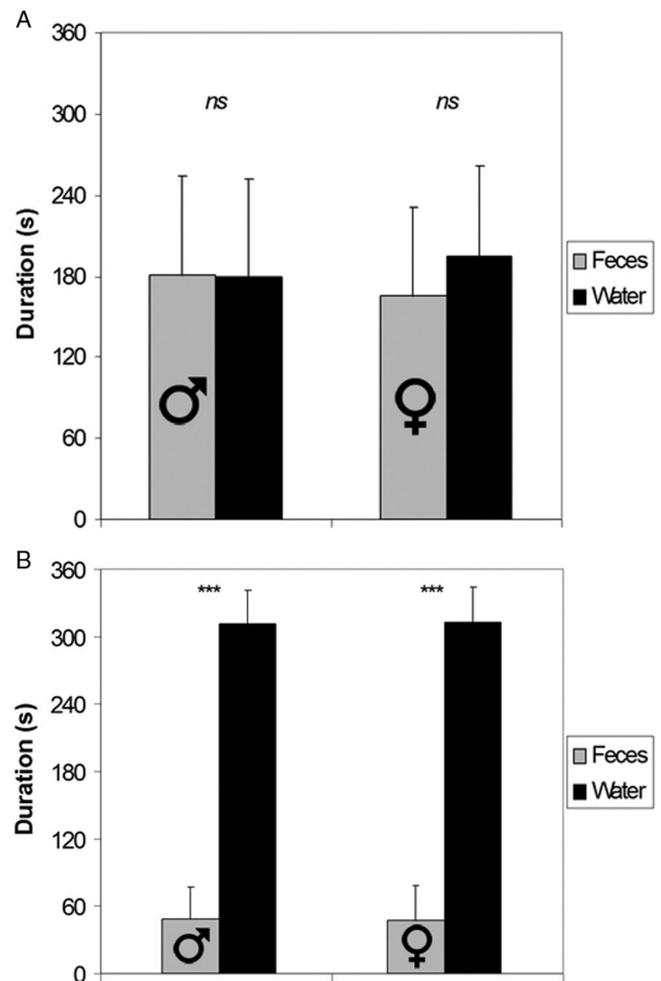


Figure 2. Comparison between occupation of fox feces (by sex) and water zones for male (A) and female (B) mouse groups.  $n = 10$  for each group. \*\*\* $p < .0001$ . Error bars indicate the standard error of the mean.

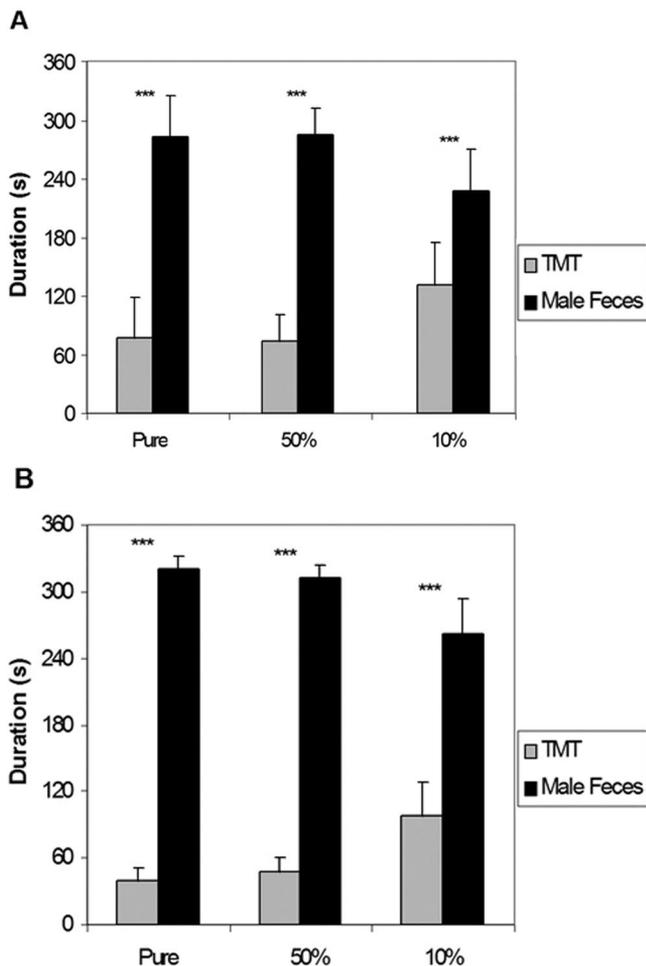


Figure 3. Comparison between occupation of 2,4,5-trimethylthiazoline (TMT) and male fox feces zones for male (A) and female (B) mouse groups.  $n = 10$  for each group. \*\*\* $p < .0001$ . Error bars indicate the standard error of the mean.

significant effect of each variable, that is, concentration,  $F(2, 38) = 15.43$ ,  $p < .0001$ , and sex,  $F(1, 19) = 17.45$ ,  $p < .0003$ . A significant interaction was observed between both variables,  $F(2, 38) = 4.546$ ,  $p < .01$ .

Post hoc Scheffé tests showed that no difference was observed between pure and 50% TMT for the male mouse group,  $F(18) = 0.082$ , *ns*, as well as for the female one,  $F(18) = 0.981$ , *ns*). The avoidance was significantly higher for pure TMT versus 10% TMT in the female mouse group,  $F(18) = 10.24$ ,  $p < .05$ , but not in the male one,  $F(18) = 3.051$ , *ns*. In the same way, the avoidance was significantly higher for 50% TMT versus 10% TMT in the female mouse group,  $F(18) = 4.885$ ,  $p < .05$ , but not in the male one,  $F(18) = 2.133$ , *ns*.

Post hoc Scheffé tests showed that the avoidance of female fox feces was significantly higher for the female mice compared to the male mouse group for 10% TMT,  $F(18) = 18.06$ ,  $p < .05$ , but there was no difference in relation to sex for 50% TMT,  $F(18) = 3.42$ , *ns*, as well as for pure TMT,  $F(18) = 1.78$ , *ns*.

### Male Feces Versus Female Feces

Results are reported in Figure 5. A 2 (feces)  $\times$  2 (sex) ANOVA yielded a significant effect of each variable: feces,  $F(1, 19) = 8.479$ ,  $p < .009$ , and sex,  $F(1, 19) = 5.624$ ,  $p < .01$ . A significant interaction was observed between both variables,  $F(1, 19) = 7.186$ ,  $p < .01$ . Post hoc Scheffé tests showed that the female mouse group significantly avoided the male fox feces zone compared to the female fox feces zone,  $F(18) = 25.769$ ,  $p < .0001$ , whereas no difference appeared for the male mouse group,  $F(18) = 0.944$ , *ns*.

## Experiment 2

### Materials and Methods

#### Subjects

Subjects were 10 adult female OF-1 mice (Charles River, France), different from the mice in Experiment 1, but housed and used in the same condition.

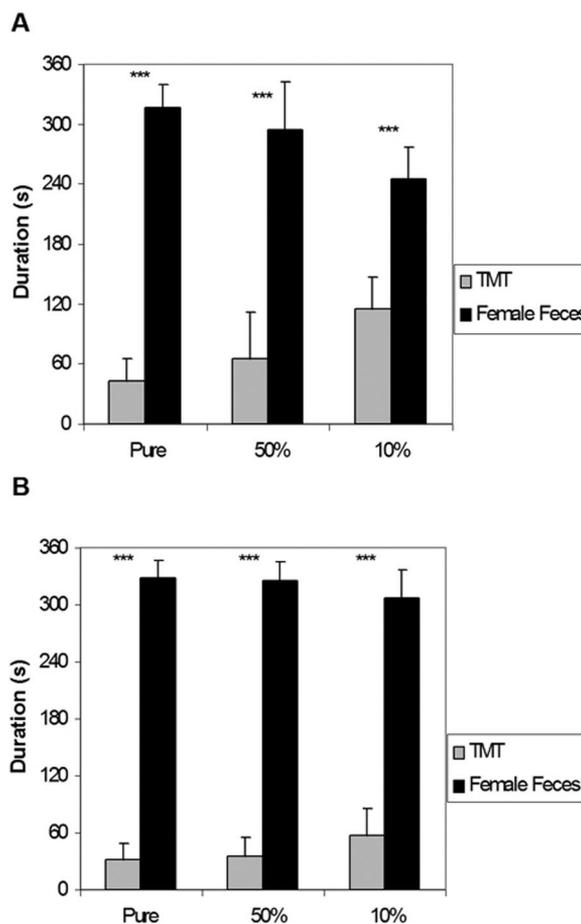


Figure 4. Comparison between occupation of 2,4,5-trimethylthiazoline (TMT) and female fox feces zones for male (A) and female (B) mouse groups.  $n = 10$  for each group. \*\*\* $p < .0001$ . Error bars indicate the standard error of the mean.

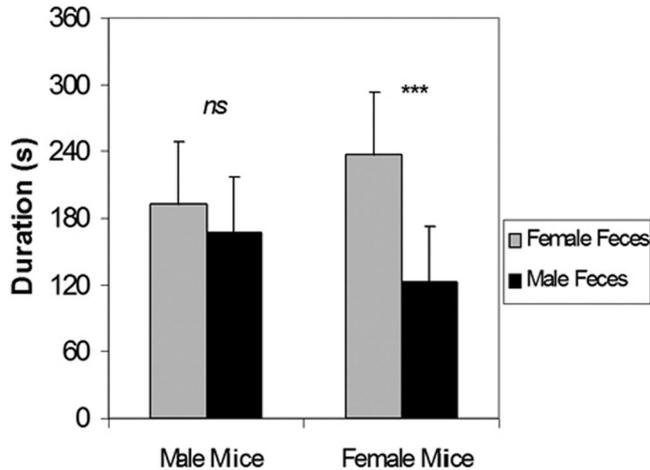


Figure 5. Comparison between occupation of male and female fox feces zones by male and female mice. \*\*\*  $p < .0001$ . Error bars indicate the standard error of the mean.

### Vaginal Smears

Following a 1-week adjustment period to determine normal estrus cycling, the vaginal samples were collected from the mice between noon and 1:00 p.m. at the completion of each experiment. Vaginal smears were obtained by immersing a sterile cotton-tipped applicator in physiological saline, gently inserting the swab into the vagina, and smearing the adhering material thinly and uniformly onto a microscope slide. Smears were classified as proestrus and metestrus by estimation of the relative proportion of leukocytes, nucleated epithelial cells, and cornified epithelial cells.

### Odorants

The behavioral tests were conducted in two odorant conditions, with TMT diluted at 10% and male fox feces (as in Experiment 1) added to a control condition with water. The order of tests was entirely randomized.

### Behavioral Tests

**Elevated plus-maze.** Immediately after a 5-min exposure period in a closed open-field chamber containing the odorant stimulus, each mouse was placed in the center of the plus-maze for 3 min. The time spent in the open arms (in seconds) was recorded as an index of fear and anxiety, while the number of entries into the closed arms was recorded as an index of general activity. The odorant condition tests were separated by a rest period of 45 min.

**Open-field chamber.** The odorant stimulus was placed in the center of a black, circular open-field chamber (36 cm in diameter, 20 cm in height). Each test of 3 min was video recorded and analyzed with the EthoVision video tracking system for automation of behavioral experiments (Noldus, Wageningen, the Netherlands). Data collected with EthoVision concerned the total time of immobility (in seconds) and the velocity (in centimeters/second), two parameters considered to be an index of general activity, while the mean distance to odorant (in centimeters) was recorded as an

index of avoidance. At the same time, freezing behavior (in seconds) was also checked by the experimenter on a control screen (as distinguished from immobility recorded by the EthoVision system).

The test order in the elevated plus-maze and the open-field chamber (thoroughly cleaned after each mouse passage) was randomized. Data were statistically evaluated using analysis of variance (ANOVA). *Post hoc* analyses following significant ANOVA effects were conducted using Scheffé tests.

### Results

Data recorded in the elevated plus-maze are reported in Figure 6A for the number of entries (closed arms) and in Figure 6B for the time spent (open arms). Data recorded in the open-field chamber are reported in Figure 7A for the immobility duration, in Figure 7B for the velocity, in Figure 7C for the freezing duration, and in Figure 7D for the distance to odorant.

Results of each parameter were analyzed with a 3 (odorant)  $\times$  2 (cycle period) ANOVA. The ANOVAs revealed an odorant effect for all parameters in the elevated plus-maze: number of

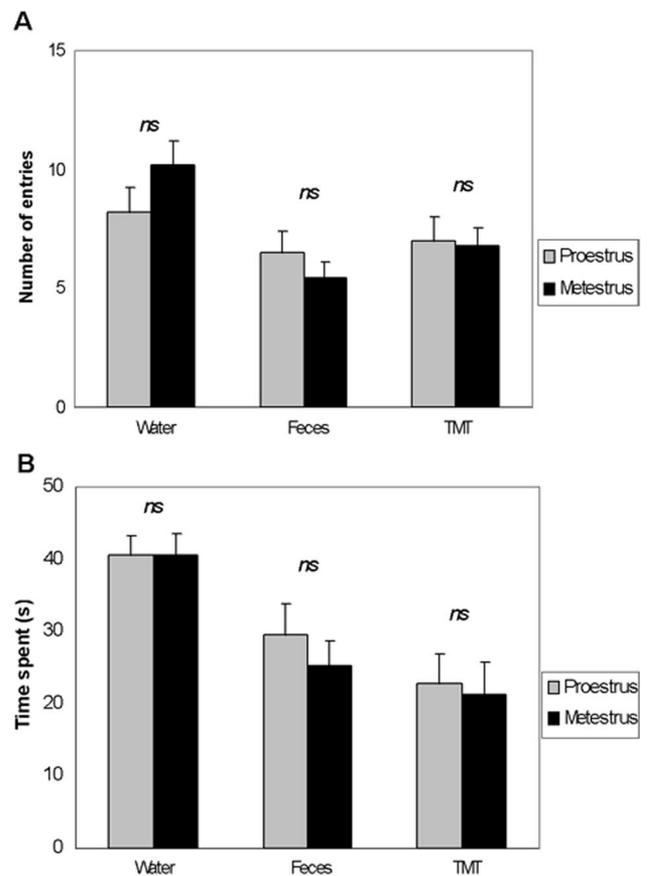


Figure 6. Comparison of number of entries into closed arms in elevated plus-maze (A) and time spent in open arms in elevated plus-maze (B) between proestrus and metestrus in two odorant conditions and the control condition.  $n = 10$  for each group. TMT = 2,4,5-trimethylthiazoline. Error bars indicate the standard error of the mean.

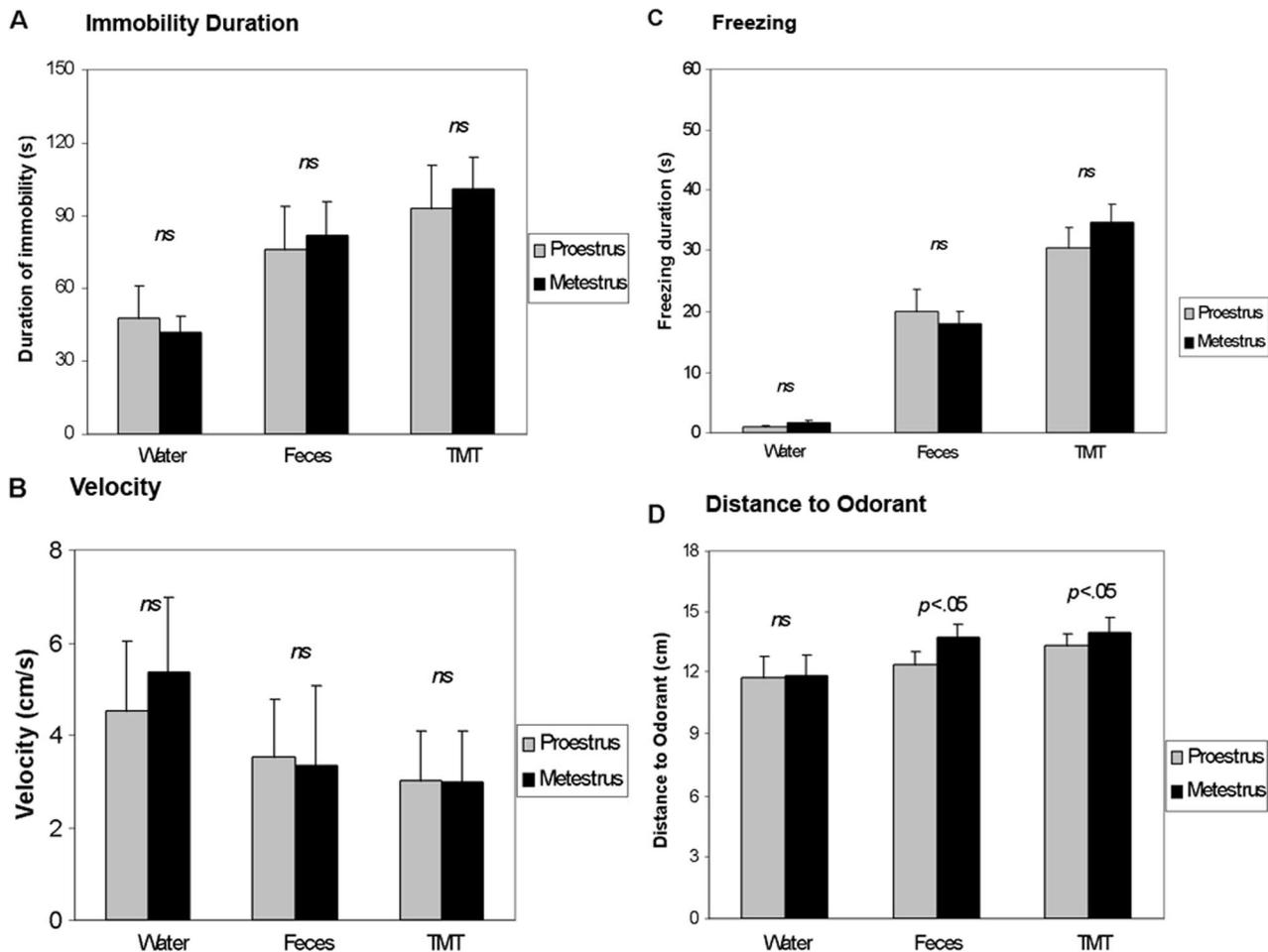


Figure 7. Comparison of immobility duration (A), velocity (B), freezing (C), and distance to odorant (D) in an open-field chamber between proestrus and metestrus in two odorant conditions and the control condition.  $n = 10$  for each group. TMT = 2,4,5-trimethylthiazoline. Error bars indicate the standard error of the mean.

entries (closed arms),  $F(2, 18) = 6.671, p < .004$ , and time spent (open arms),  $F(2, 18) = 9.968, p < .0006$ , in the open-field chamber: immobility,  $F(2, 18) = 52.623, p < .0001$ ; velocity,  $F(2, 18) = 6.788, p < .004$ ; freezing,  $F(2, 18) = 57.315, p < .0001$ ; and distance to odorant,  $F(2, 18) = 20.026, p < .0001$ . In contrast, no significant effect of cycle period was observed for all parameters except for the distance to odorant in the elevated plus-maze for the number of entries (closed arms),  $F(1, 9) = 0.168, ns$ , as well as for the time spent (open arms),  $F(1, 9) = 0.667, ns$ , in the open-field chamber: immobility,  $F(1, 9) = 0.965, ns$ ; velocity,  $F(1, 9) = 0.829, ns$ ; freezing,  $F(1, 9) = 0.602, ns$ ; and distance to odorant,  $F(1, 9) = 21.481, p < .0001$ .

No significant interaction between factors was observed for all parameters except for the distance to odorant in the elevated plus-maze for the number of entries,  $F(2, 18) = 2.616, ns$ , as well as for the time spent,  $F(2, 18) = 0.280, ns$ , in the open-field: immobility,  $F(2, 18) = 2.284, ns$ ; velocity,  $F(2, 18) = 1.776, ns$ ; freezing,  $F(2, 18) = 1.161, ns$ ; and distance to odorant,  $F(2, 18) = 6.048, p < .006$ .

For the five parameters without cycle period effect, post hoc Scheffé tests concerning the odorant factor are reported in Table 1. The analyses revealed systematic differences between water and feces conditions as well as between water and 10% TMT conditions. In contrast, no differences appeared between feces and 10% TMT for all parameters except for freezing.

For the distance to odorant, post hoc Scheffé tests indicated a significant difference in relation to cycle period with natural fox feces ( $F = 21.156, p < .05$ ), as well as with 10% TMT, ( $F = 5.602, p < .05$ ), corresponding in each case to an increase of the distance to odorant in metestrus compared to proestrus. No significant difference was observed in the water control condition ( $F = 0.036, ns$ ). Moreover, ANOVA indicated an odorant effect in proestrus,  $F(1, 9) = 20.653, p < .0001$ , as well as in metestrus,  $F(1, 9) = 10.969, p < .0003$ . Post hoc Scheffé tests (see Table 1) showed that the distance to odorant was significantly higher with 10% TMT than water in proestrus as well as in metestrus. In contrast, differences appeared in relation to the cycle period in water versus feces and feces versus 10% TMT comparisons.

Table 1  
Odorant Condition Comparisons for Each Behavioral Parameter

Variable	Water vs. Feces		Water vs. TMT 10%		Feces vs. TMT 10%	
	<i>F</i> (18)	<i>p</i>	<i>F</i> (18)	<i>p</i>	<i>F</i> (18)	<i>p</i>
No. of entries in closed arms	5.234	<.05	4.762	<.05	0.011	<i>ns</i>
Time spent in open arms	4.717	<.05	9.428	<.05	0.808	<i>ns</i>
Immobility	22.092	<.05	50.913	<.05	2.830	<i>ns</i>
Velocity	3.773	<.05	6.125	<.05	0.283	<i>ns</i>
Freezing	18.472	<.05	56.948	<.05	10.552	<.05
Distance to odorant (proestrus)	1.536	<i>ns</i>	10.755	<.05	4.162	<.05
Distance to odorant (metestrus)	13.441	<.05	17.296	<.05	0.243	<i>ns</i>

Note. TMT = 2,4,5-trimethylthiazoline.

### Discussion

The results of Experiment 1 confirm that TMT appears to be a strong repulsive odor for mice, and are in agreement with other common findings showing that rodents tend to avoid the location of an environment in which TMT is present (Burwash, Tobin, Woolhouse, & Sullivan, 1998a; Vernet-Maury, Constant, & Chanel, 1992; Wallace & Rosen, 2000). Specifically, data show that there are no differences in avoidance between pure TMT and 50% diluted TMT. In contrast, TMT diluted at 10% is clearly less repulsive. It is interesting that the avoidance is higher in female mice than in male mice with pure and 50% diluted TMT, whereas there is no difference in relation to sex with 10% diluted TMT. These findings are congruent with other data showing that females are more sensitive than males to odors, especially to repulsive ones (Apfelbach, Blanchard, Blanchard, Hayes, & McGregor, 2005) and could indicate that sex differences are also dependent on odor concentration.

Second, the results indicate that natural fox feces appear repulsive for mice, whatever the sex of the predator. However, the avoidance is only observed in the female mouse group. Indeed, male mice do not avoid the fox feces (whatever the sex of the predator), whereas female mice show strong avoidance with both male and female fox feces.

Third, TMT appears more repulsive than fox feces, whatever the concentration used. In this comparison, the avoidance to TMT is always higher in the female mouse group than in the male group, whatever the concentration. In other words, for female mice the female fox feces appear less repulsive than for male mice. This observed sex difference is confirmed by the direct comparison between male and female fox feces. In predator species, feces odors contain individual information such as sexual status (Drea, Vignieri, Kim, Weldele, & Glickman, 2002), and scent marking is usually done by males. Insofar as female mice are more sensitive than males, the present findings could suggest that females are able to smell some slight differences (e.g., intensity, compound particularities) between male and female predator odors.

The findings of the first experiment raise the question of the concentration used in experimental studies. Indeed, most of the TMT studies have exposed rodents to very intense concentrations; it is difficult to compare the results with those obtained with natural predator odors, insofar as TMT is frequently presented in

a concentration that probably does not correspond to the concentration of a predator odor in natural conditions. The results of the present study agree with previous findings indicating that avoidance is TMT dose-dependent (Blanchard, Markham, et al., 2003). Data suggest that the 10% concentration is more comparable to natural fox feces than pure TMT and are in agreement with other studies (Blanchard, Markham, et al., 2003; Endres et al., 2005; Wallace & Rosen, 2000), which indicate that lower levels of freezing—similar to the freezing durations observed during exposure to cat odor—are generally observed with lower concentrations of TMT.

In addition, the findings of the first experiment show that the sex of the predator could have a slight influence on the avoidance. In contrast, there are important differences in relation to the sex of mice. The avoidance is significantly higher in female mice and could be related to other findings that indicate sex differences in rodent fear responses (Archer, 1975; Perrot-Sinal, Ossenkopp, & Kavaliers, 2000; Stock et al., 2001) are possibly related to levels of a sex gonadic hormone such as testosterone (King, De Oliveira, & Patel, 2005).

The results of Experiment 2 do not show any significant effect of the cycle period on behavioral parameters, except for the distance to odor considered as an avoidance index. Results reveal a gradual effect in avoidance from water condition (not repulsive) to fox feces and to TMT (more repulsive). More precisely, females appear more sensitive to TMT than to the natural odor of fox feces in proestrus than they do in metestrus. Furthermore, it has been shown that individual differences occur in mice (Hebb et al., 2004) with high and low responses to TMT in behavioral tests. We find it interesting that the high responders to TMT also exhibit a high level of anxiety during light–dark tests. More significantly, mouse strains also differ in their responses and susceptibility to predator odor stress stimuli (Anisman, Hayley, Kelly, Borowski, & Merali, 2001), as do rat strains (Rosen, West, & Donley, 2006; Staples & McGregor, 2006).

In Experiment 2, behavioral measures in the elevated plus-maze and open-field chamber lead to the conclusion that 10% TMT represents a closer olfactory signal to natural fox feces than pure TMT, which is frequently used to induce fear responses in rodents. Actually, no difference was observed in general activity and anxiety traits, except in freezing time, for which 10% TMT was a

higher signal than natural fox feces. Thus, among the parameters considered in this experiment, freezing could be considered the only one making a difference between both odorant conditions. These findings corroborate other studies of rodents dealing with behavioral characteristics of anxiety in which the freezing behavior increased in relation to the level of stress conditions (Benaroya-Milshtein et al., 2004; Takahashi et al., 2005; Zurita, Martineja, Cuadra, Brandao, & Molina, 2000). Moreover, freezing makes a strong discrimination in relation to the intensity of stressor situations (Chen, Shemyakin, & Wiedenmayer, 2006).

From a methodological point of view, the avoidance as fear response appears less questionable compared to data obtained with behaviors. Indeed, in experimental studies, results of quantified behaviors are quite varied, probably due to differences in design, duration of exposure, concentration used, ventilation of apparatus, training, and so on. For instance, there are some limitations with comparative measures of freezing, the most prominent behavioral sign of fear in rodents. In the study of Fendt et al. (2003), animals—before TMT presentation—showed a freezing rate of between 20% and 40%. This is a higher rate than the one observed by Wallace and Rosen (2000), who reported a freezing response at baseline between 10% and 20%. Likewise, other studies reported a freezing response at baseline of almost 0% (Anagnostaras, Maren, & Fanselow, 1999; Maren, Aharanov, & Fanselow, 1997). However, in Fendt et al. (2003) an intracranial injection (i.e., a strong handling procedure) was done immediately before behavioral testing. In some cases no freezing behavior was noted during TMT exposure, probably due to the environmental context of experiments or genetic differences between the animal groups tested. Moreover, the avoidance assessment is relevant during a short period of time (5 min). In contrast, most behavior studies exposed the animals to TMT for 5–20 min (McGregor et al., 2002; Morrow et al., 2000; Wallace & Rosen, 2000), which raises the question of adaptation or sensitization to the stimulus.

Undoubtedly, the main finding of the present study is that TMT induced a higher avoidance than natural fox feces. Moreover, the difference is smaller in the case of TMT diluted at 10%, suggesting that the pure TMT frequently used in experimental studies is not appropriate; this raises the question of the possible role of the irritating properties of TMT. From a fundamental point of view, the possibility cannot be excluded that the pungent property of TMT rather than its specific predatory qualities induces avoidance. Synthetic TMT probably activates not only the olfactory system (CN I) but also strongly activates the trigeminal system (CN V) and induces a number of behavioral responses via this protective system (Brand, 2006). In this regard, it has been shown that nonpredatory odors—especially with trigeminal compound—induced immobility under confined conditions (Wallace & Rosen, 2000). Moreover, the avoidance of TMT in this study appears no different from that observed in the same manner with toluene (Jacquot, Pourie, Buron, Monnin, & Brand, 2006). We find it interesting that toluene has been shown to elicit the same beta bursts as TMT when presented for a short time in awake (Chapman, Xu, Haykin, & Racine, 1998) and anesthetized rats (Neville & Haberly, 2003), suggesting the same possible effect of trigeminal activation. Indeed, molecules that activate the trigeminal system indicate possible harmful compounds, and animals frequently present specific behaviors to them, including fear behaviors. Un-

fortunately, TMT is almost always compared with plain air, and there are few studies in which the effects of TMT have been differentiated from those of other pungent odors producing trigeminal activation. In several studies cited above, TMT appeared to produce similar effects to other irritating odors. Coupled with the absence of defensive behaviors elicited by TMT, the conclusion that TMT acts more as an irritating smell than as a specific predatory odor is conceivable.

Other findings suggest that TMT operates more specifically as an anxiogenic agent and elicits analgesia in rodents, an effect often seen with fear-induced stimuli (Hotsenpiller & Williams, 1997). It is well known that pungent stimuli can produce analgesia (Brand, 2006) following activation of trigeminal nerve endings in the nasal cavities. In the same way, it has been shown that cat odor induces habituation of the hiding response with time (Dielenberg & McGregor, 1999), contrary to the immobility response to TMT (Wallace & Rosen, 2000). The lack of habituation frequently observed with TMT also suggests a process more characteristic of a trigeminal stimulus than a specific predatory cue. Recently, it has been shown (Siviy, Harrison, & McGregor, 2006) that brief exposure to a cat predator odor has an impact on the playfulness of juvenile rats. Although play activity was also suppressed with TMT, the results were similar to those obtained with the pungent nonpredator odor triethylamine. These findings confirm the possibility that TMT may be reducing play activity as a consequence of its trigeminal properties rather than its ability to induce innate fear.

Finally, it could be interesting to consider the possibility that natural fox feces may induce trigeminal activation. Indeed, the experimenters of the present work clearly noted that the natural fox feces had a very unpleasant odor but no pungent properties, contrary to the synthetic TMT. In the same way, further research could investigate the rodent behavioral responses to TMT after nasal axotomy of the trigeminal nerve to investigate the role of this nerve, as the trigeminal olfactory system is an important part of odor perception (Hummel & Livermore, 2002). Other studies, such as long-term exposure like the toluene exposure experiments cited above (Jacquot et al., 2006), could corroborate or disprove the hypothesis suggested first by McGregor et al. (2002), in which TMT is not a natural predator odor but rather a noxious stimulus.

## References

- Anagnostaras, S. G., Maren, S., & Fanselow, M. S. (1999). Temporally graded retrograde amnesia of contextual fear after hippocampal damage in rats: Within-examination. *Journal of Neuroscience*, *19*, 1106–1114.
- Anisman, H., Hayley, S., Kelly, O., Borowski, T., & Merali, Z. (2001). Psychogenic, neurogenic, and systemic stressor effect on plasma corticosterone and behavior: Mouse strain-dependent outcomes. *Behavioral Neuroscience*, *115*, 443–454.
- Apfelbach, R., Blanchard, C. D., Blanchard, R. J., Hayes, R. A., & McGregor, I. S. (2005). The effects of predator odors in mammalian prey species: A review of field and laboratory studies. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, *29*, 1123–1144.
- Archer, J. (1975). Rodent sex differences in emotional and related behaviour. *Behavioral Biology*, *14*, 451–479.
- Belzung, C., Elhage, W., Moindrot, N., & Griebel, G. (2001). Behavioral and neurochemical changes following predatory stress in mice. *Neuropharmacology*, *41*, 400–408.

- Benaroya-Milshtein, N., Hollander, N., Apter, A., Kukulansky, T., Raz, N., Wilf, A., et al. (2004). Environmental enrichment in mice decreases anxiety, attenuates stress responses and enhances natural killer cell activity. *European Journal of Neuroscience*, *20*, 1341–1347.
- Blanchard, D. C., Griebel, G., & Blanchard, R. J. (2003). Conditioning and residual emotionality effects of predator stimuli: Some reflections on stress and emotion. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, *27*, 1177–1185.
- Blanchard, D. C., Markham, C., Yang, M., Hubbard, D., Madarang, E., & Blanchard, R. J. (2003). Failure to produce conditioning with low-dose trimethylthiazoline or cat feces as unconditioned stimuli. *Behavioral Neuroscience*, *117*, 360–368.
- Brand, G. (2006). Olfactory/trigeminal interactions in nasal chemoreception. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, *30*, 908–917.
- Burwash, M. D., Tobin, M. E., Woolhouse, A. D., & Sullivan, T. P. (1998a). Field testing synthetic predator odor for roof rats (*Rattus rattus*) in Hawaiian macadamia nut orchards. *Journal of Chemical Ecology*, *24*, 603–630.
- Burwash, M. D., Tobin, M. E., Woolhouse, A. D., & Sullivan, T. P. (1998b). Laboratory evaluation of predator odors for roof rats (*Rattus rattus*). *Journal of Chemical Ecology*, *24*, 49–66.
- Chapman, C. A., Xu, Y., Haykin, S., & Racine, R. J. (1998). Beta-frequency (15–35 Hz) electro-encephalogram activities elicited by toluene and electrical stimulation in the behaving rat. *Neuroscience*, *86*, 1307–1319.
- Chen, S. W., Shemyakin, A., & Wiedenmayer, C. P. (2006). The role of the amygdala and olfaction in unconditioned fear in developing rats. *Journal of Neuroscience*, *26*, 233–240.
- Day, H. E., Masini, C. V., & Campeau, S. (2004). The pattern of brain *c-fos* mRNA induced by a component of fox odor, 2,5-dihydro-2,4,5-trimethylthiazoline (TMT), in rats, suggests both systemic and processive stress characteristics. *Brain Research*, *1025*, 139–151.
- Dielenberg, R. A., & McGregor, I. S. (1999). Habituation of the hiding response to predatory odor in rats (*Rattus norvegicus*). *Journal of Comparative Psychology*, *113*, 376–387.
- Dielenberg, R. A., & McGregor, I. S. (2001). Defensive behavior in rats towards predatory odors: A review. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, *25*, 597–609.
- Drea, C. M., Vignieri, S. N., Kim, H. S., Weldele, M. L., & Glickman, S. E. (2002). Responses to olfactory stimuli in spotted hyenas (*Crocuta crocuta*): II. Discrimination of conspecific scent. *Journal of Comparative Psychology*, *116*, 342–349.
- Endres, T., Apfelbach, R., & Fendt, M. (2005). Behavioral changes induced in rats by exposure to trimethylthiazoline, a component of fox odor. *Behavioral Neuroscience*, *119*, 1004–1010.
- Fendt, M., Endres, T., & Apfelbach, R. (2003). Temporary inactivation of the bed nucleus of the stria terminalis but not of the amygdala blocks freezing induced by trimethylthiazoline, a component of fox feces. *Journal of Neuroscience*, *23*, 23–28.
- Fendt, M., Endres, T., Lowry, C. A., Apfelbach, R., & McGregor, I. S. (2005). TMT-induced autonomic and behavioral changes and the neural basis of its processing. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, *29*, 1145–1156.
- Fendt, M., & Fanselow, M. S. (1999). The neuroanatomical and neurochemical basis of conditioned fear. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, *23*, 743–760.
- Gao, B., & Cutler, M. G. (1993). Effects of chlordiazepoxide, buspirone and the 5-HT<sub>3</sub> receptor antagonist, BRL 46470, on the behaviour of oestrus and dioestrus female mice when encountering male partners. *Neuropharmacology*, *32*, 969–975.
- Hebb, A. L., Zacharko, R. M., Gauthier, M., & Drolet, G. (2003). Exposure of mice to a predator odor increases acoustic startle but does not disrupt the rewarding properties of VTA intracranial self-stimulation. *Brain Research*, *982*, 195–210.
- Hebb, A. L., Zacharko, R. M., Gauthier, M., Trudel, F., Laforest, S., & Drolet, G. (2004). Brief exposure to predator odor and resultant anxiety enhances mesocorticolimbic activity and enkephalin expression in CD-1 mice. *European Journal of Neuroscience*, *20*, 2415–2429.
- Holmes, M. M., & Galea, L. A. M. (2002). Defensive behavior and hippocampal cell proliferation: Differential modulation by naltrexone during stress. *Behavioral Neuroscience*, *116*, 160–168.
- Hotsenpiller, G., & Williams, J. (1997). A synthetic predator odor (TMT) enhances conditioned analgesia and fear when paired with a benzodiazepine receptor inverse agonist (FG-7142). *Psychobiology*, *25*, 83–88.
- Hummel, T., & Livermore, A. (2002). Intranasal chemosensory function of the trigeminal nerve and aspects of its relation to olfaction. *International Archives of Occupational and Environmental Health*, *75*, 305–313.
- Jacquot, L., Pourie, G., Buron, G., Monnin, J., & Brand, G. (2006). Effects of toluene inhalation exposure on olfactory functioning: Behavioral and histological assessment. *Toxicology Letters*, *165*, 57–65.
- Kats, L. B., & Dill, L. M. (1998). The scent of death: Chemosensory assessment of predator risk by prey animals. *Ecoscience*, *5*, 361–394.
- King, J. A., De Oliveira, W. L., & Patel, N. (2005). Deficits in testosterone facilitate enhanced fear response. *Psychoneuroendocrinology*, *30*, 333–340.
- Marcondes, F. K., Miguel, K. J., Melo, L. L., Spadari-Bratfisch, R. C. (2001). Estrous cycle influences the response of female rats in the elevated plus-maze. *Physiology & Behavior*, *74*, 435–440.
- Maren, S., Aharanov, G., & Fanselow, M. S. (1997). Neurotoxic lesions of the dorsal hippocampus and Pavlovian fear conditioning in rats. *Behavioral Brain Research*, *88*, 261–274.
- McGregor, I. S., Schrama, L., Ambermoon, P., & Dielenberg, R. A. (2002). Not all “predator odors” are equal: Cat odor but not 2,4,5-trimethylthiazoline (TMT; fox odors) elicits specific defensive behaviours in rats. *Behavioural Brain Research*, *129*, 1–16.
- Morrow, B. A., Elsworth, J. D., & Roth, R. H. (2002). Fear-like biochemical and behavioral responses in rats to predator odor, TMT, are dependent on the exposure environment. *Synapse*, *46*, 11–18.
- Morrow, B. A., Redmond, A. J., Roth, R. H., & Elsworth, J. D. (2000). The predator odor, TMT, displays a unique, stress-like pattern of dopaminergic and endocrinological activation in the rat. *Brain Research*, *864*, 146–151.
- Neville, K. R., & Haberly, L. B. (2003). Beta and gamma oscillations in the olfactory system of the urethane-anesthetized rat. *Journal of Neurophysiology*, *90*, 3921–3930.
- Perrot-Sinal, T., Ossenkopp, K. P., & Kavaliers, M. (2000). Influence of a natural stressor (predator odor) on locomotor activity in the meadow vole (*Microtus pennsylvanicus*): Modulation by sex, reproductive condition, and gonadal hormones. *Psychoneuroendocrinology*, *25*, 259–276.
- Rosen, J. B. (2004). The neurobiology of conditioned and unconditioned fear: A neurobehavioral system analysis of the amygdala. *Behavioral and Cognitive Neuroscience Reviews*, *3*, 23–41.
- Rosen, J. B., West, E. A., & Donley, M. P. (2006). Not all rat strains are equal: Differential unconditioned fear responses to the synthetic fox odor 2,4,5-trimethylthiazoline in three outbred rat strains. *Behavioral Neuroscience*, *120*, 290–297.
- Schmidt, C., & Schmidt, U. (1980). Changes of olfactory sensitivity during the estrus cycle in female laboratory mice. *Chemical Senses*, *5*, 359–365.
- Siviy, S. M., Harrison, K. A., & McGregor, I. S. (2006). Fear, risk assessment, and playfulness in the juvenile rat. *Behavioral Neuroscience*, *120*, 49–59.
- Staples, L. G., & McGregor, I. S. (2006). Defensive responses of Wistar

- and Sprague–Dawley rats to cat odour and TMT. *Behavioural Brain Research*, *172*, 351–354.
- Stock, H. S., Caldarone, B., Abrahamsen, G., Mongeluzi, D., Wilson, M. A., & Rosellini, R. A. (2001). Sex differences in relation to conditioned fear-induced enhancement of morphine analgesia. *Physiology & Behavior*, *72*, 439–447.
- Takahashi, L. K., Nakashima, B. R., Hong, H., & Watanabe, K. (2005). The smell of danger: A behavioral and neural analysis of predator odor-induced fear. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, *29*, 1157–1167.
- Vernet-Maury, E. (1980). Trimethylthiazoline in fox feces: A natural alarming substance for the rat. In H. Van der Starre (Ed.), *Olfaction and taste* (Vol. 7, p. 407). Washington, DC: IRL Press.
- Vernet-Maury, E., Constant, B., & Chanel, J. (1992). Repellent effect of trimethylthiazoline in the wild rat *Rattus norvegicus*. In R. L. Doty & D. Muller-Schwarz (Eds.), *Chemical signals in vertebrates* (Vol. 6, pp. 305–310). New York: Plenum Press.
- Vernet-Maury, E., Polak, E. H., & Demael, A. (1984). Structure–activity relationship of stress inducing odorants in the rat. *Journal of Chemical Ecology*, *10*, 997–1018.
- Wallace, K. J., & Rosen, J. B. (2000). Predator odor as an unconditioned fear stimulus in rats: Elicitation of freezing by trimethylthiazoline, a component of fox faeces. *Behavioral Neuroscience*, *114*, 912–922.
- Zangrossi, H. J., & File, S. E. (1992). Behavioral consequences in animal tests of anxiety and exploration of exposure to cat odor. *Brain Research Bulletin*, *29*, 381–388.
- Zhang, J. X., Soini, H. A., Bruce, K. E., Wiesler, D., Woodley, S. K., Baum, M. J., & Novotny, M. V. (2005). Putative chemosignals of the ferret (*Mustela furo*) associated with individual and gender recognition. *Chemical Senses*, *30*, 727–737.
- Zurita, A., Martineja, I., Cuadra, G., Brandao, M. L., & Molina, V. (2000). Early exposure to chronic variable stress facilitates the occurrence of anhedonia and enhanced emotional reactions to novel stressors: Reversal by naltrexone pretreatment. *Behavioral Brain Research*, *117*, 163–171.

Received February 16, 2007

Revision received April 5, 2007

Accepted April 6, 2007 ■

## **Résumé**

Les systèmes chimiosensoriels présents dans la cavité nasale constituent des mécanismes complexes permettant de détecter une large variété de stimuli. Chez les rongeurs, deux systèmes principaux coexistent: le système olfactif principal et le système olfactif accessoire. Ils permettent la détection d'informations chimiques olfactives et phéromonales nécessaires à l'adaptation d'un individu au milieu. Ils renseignent sur la présence de prédateur ou de nourriture et apportant des informations sur l'espèce, le genre et le statut reproductif de congénères. Parallèlement et en raison de leur situation anatomique, ces systèmes s'avèrent vulnérables aux nombreuses substances chimiques présentes dans l'air ambiant. L'objectif des recherches réalisés dans le cadre de cette thèse est de déterminer les effets de l'exposition (pendant et après) à des substances volatiles toxiques sur les neuroépithéliums principal et voméronasal, au niveau comportemental, histologique et immunohistochimique. D'un point de vue méthodologique, les études comportementales consistent en des tests de sensibilité réalisés en labyrinthe en Y ou en corridor. Les mesures histologiques visent à déterminer les épaisseurs ainsi que la densité nucléaire des épithéliums. Enfin, des marquages immunohistochimiques permettent d'évaluer l'évolution du nombre de neurones matures (marqués par l'OMP) et des cellules basales progénitrices (marquées par le PCNA) dans l'épithélium du système olfactif principal au cours des différentes expérimentations. Les résultats des études réalisées montrent des effets différenciés en fonction de la molécule, de la durée et de la concentration d'exposition. De plus, les résultats montrent des atteintes de l'épithélium de l'organe voméronasal, qui apparaissent de façon générale moins sévères que celles observées sur l'épithélium olfactif. L'ensemble des travaux de cette thèse apporte des informations toxicologiques sur des molécules chimiques encore peu étudiées. Les dommages observés en fonction des différents paramètres mesurés confirment l'hétérogénéité fonctionnelle des systèmes chimiosensoriels présents dans la cavité nasale. Plus largement, ces études ouvrent la voie à des axes de recherche sur les spécificités des processus cellulaires mis en jeu lors des atteintes épithéliales dans la cavité nasale et lors de processus de régénération.

*Mots-clés:* système olfactif principal – système olfactif accessoire – épithélium sensoriel – solvants – comportement – neurones olfactifs – PCNA – OMP

## **Abstract**

Chemosensory systems, located in the nasal cavity, constitute complex mechanisms that detect a large variety of stimuli. In rodents, two anatomically and functionally distinct chemosensory systems coexist: the main olfactory system and the accessory olfactory system. Together, they detect general odors as well as social cues, and allow adaptative behavior in relation to food, danger, including predators, and mates, all crucial elements for survival. The nasal cavity represents the entry to the respiratory tract and both olfactory systems are susceptible to chemical-induced injuries due to exposure to inhaled toxicants. The aim of this thesis is to assess the effects of chemicals inhalants exposure on main and accessory neuroepitheliums at the behavioural, histological and immunohistological levels. From a methodological point of view, behavioural tests were designed to evaluate olfactory sensitivity using a corridor shape maze or a Y maze. Histological measurements were used to determine the thickness and cellular density of the neuroepitheliums. Finally, immunohistochemistry protocols allowed to localize and quantify matures olfactory neurons (using OMP) and proliferating basal cells (using PCNA) in the main olfactory epithelium. The results show some differentiated effects depending on the type of molecule, the duration and concentration of exposure. Moreover, the results indicate less severe injuries on the epithelium of the accessory olfactory system compared to those observed on the main olfactory epithelium. This thesis provides toxicological information on chemical substances that have rarely been studied so far. The injuries observed differ according to the different parameters considered, confirm the functional heterogeneity of the two olfactory systems. In future studies, it would be interesting to investigate the specificity of cellular processes involved in epithelial injuries on the nasal cavity, and in the regeneration processes.

*Key-words:* main olfactory system – accessory olfactory system – neuroepitheliums – chemical inhalant – behaviour – olfactory neurons – PCNA – OMP