

SOMMAIRE

PRESENTATION DE L'OUVRAGE	1
PREMIERE PARTIE: SUPPORTS NERVEUX ET MOLECULAIRES	3
1. Description synthétique de la muqueuse olfactive des vertébrés	3
1.1. Les cellules réceptrices olfactives	3
1.1.1. Une nature neuronale	3
1.1.2. Les cils olfactifs, siège de la transduction olfactive	6
1.2. Les cellules basales	7
1.3. Les cellules de soutien	8
1.4. Les glandes de la cavité nasale, le mucus et les protéines solubles de transport	9
1.5. Les innervations extrinsèques	12
1.6. Territoire de projection des neurorécepteurs : le bulbe olfactif	14
1.6.1. Organisation du bulbe olfactif	14
1.6.2. Organisation des projections épithélio-bulbaires	17
1.6.2.1. Données anatomiques et topographiques	17
1.6.2.2. Données fonctionnelles	18
2. Données neurobiologiques et fonctionnelles complémentaires	19
2.1. La maturation des neurorécepteurs olfactifs	19
2.2. Le renouvellement des neurorécepteurs olfactifs	20
2.3. Sensibilité électrophysiologique aux stimulations chimiques	21
2.3.1. L'électro-olfactogramme (EOG)	21
2.3.2. L'activité unitaire des neurorécepteurs olfactifs	23
2.3.2.1. L'enregistrement intracellulaire et les courants ioniques	23
2.3.2.2. L'enregistrement extracellulaire : recueil de l'activité transmise	24
2.4. Modifications expérimentales de la sensibilité de la périphérie du système olfactif	25
2.4.1. Destruction de la couche réceptrice par des agents physiques ou chimiques	25
2.4.2. Manipulations sélectives de la sensibilité aux odorants	26
2.4.3. Adaptation croisée	26
2.5. Variations régionales de la sensibilité de la muqueuse olfactive	28
2.6. Des catégories de neurones récepteurs ?	29
2.6.1. Hétérogénéité morphologique	29
2.6.2. Hétérogénéité chimique	29
2.6.2.1. Marqueurs immunologiques	29
2.6.2.2. Autres marqueurs de surface : les lectines	30
2.6.2.3. Marqueurs fluorescents	30
2.6.2.4. Des neurones sensibles au CO ₂ ?	31
3. Aspects moléculaires de la transduction olfactive	32
3.1. Les récepteurs aux odeurs	32
3.1.1. Une grande variété de protéines transmembranaires	32

3.1.2. La question de la spécificité	34
3.1.3. Aspects distributionnels	37
3.1.3.1. Ségrégation périphérique	37
3.1.3.2. Convergences bulbaires	37
3.1.4. Régulation de l'expression des gènes récepteurs	38
3.2. Les cascades enzymatiques et ioniques de la transduction sensorielle	39
3.2.1. Protéines G	39
3.2.2. Voie de l'adénosine monophosphate cyclique	40
3.2.3. Canal contrôlé par le second messenger nucléotidique	40
3.2.4. Voie de l'inositol triphosphate	42
3.2.5. Autres systèmes transducteurs potentiels	43
3.2.6. Calcium et transduction sensorielle olfactive	45
4. Conclusion de la première partie	46
DEUXIEME PARTIE : DES REPRESENTATIONS NERVEUSES DES ODEURS	47
1. Résultats expérimentaux relatifs au modèle amphibien	47
1.1. Encodage périphérique	47
1.1.1. Cadre et principe de l'étude de la discrimination des odeurs par les neurones récepteurs olfactifs	47
1.1.2. Etude de la discrimination d'une série de stimulus terpéniques et effets de la concentration.	48
1.1.2.1. Résumé	48
1.1.2.2. Article 1 : Revial, M-F., Sicard, G., Duchamp, A., and Holley, A. New studies on odour discrimination in the frog's olfactory receptor cells. I Experimental results. Chem. Senses, 1982, 7:175-190.	53
1.1.2.3. Article 2 : Revial, M-F., Sicard, G., Duchamp, A., and Holley, A. New studies on odour discrimination in the frog's olfactory receptor cells. II Mathematical analysis of electrophysiological responses. Chem. Senses, 1983, 8:179-184.	53
1.1.3. Etude d'un groupe particulier : le groupe des molécules à odeur de camphre	54
1.1.3.1. Résumé	54
1.1.3.2. Article 3 : Sicard, G. Olfactory discrimination of structurally related Molecules : Receptor responses to camphoraceous odorants. Brain Research, 1985, 326:203-212.	59
1.1.4. Récapitulation : Etude des relations entre plusieurs groupes d'odorants	60
1.1.4.1. Résumé	60
1.1.4.2. Article 4 : Sicard, G. and Holley, A. Receptor cell responses to Odorants : similarities and differences among odorants. Brain Research, 1984, 292:283-296.	63
1.2. Transfert bulbaire	64
1.2.1. Etude des modifications de la représentation périphérique par la projection et le traitement bulbaire.	64
1.2.2. Article 5 : Duchamp, A., Sicard, G. Influence of stimulus intensity on odour discrimination by olfactory bulb neurons as compared with receptor cells. Chem.	68

Senses, 1984, 8:355-366.	
2. Résultats expérimentaux relatifs au modèle mammifère	69
2.1 Encodage périphérique	69
2.1.1 Réponses électrophysiologiques des neurones récepteurs olfactifs de mammifères aux stimulations odorantes	69
2.1.2. Article 6 : Sicard, G. Electrophysiological recordings from olfactory receptor cells in adult mice. Brain Research, 1986, 397:405-408.	73
2.2. Anosmie partielle : un modèle d'altération spécifique de la sensibilité olfactive	74
2.2.1. Définition de l'anosmie spécifique : modèle humain et modèle murin	74
2.2.2. Etude de l'anosmie murine à l'acide isovalérique	75
2.2.2.1 Données comportementales originales	75
2.2.2.2. Article 7 : Pourtier, L. et Sicard, G. Comparison of the sensitivity of C57BL/6J9 and AKR/J mice to airborne molecules of isovaleric acid and amyl acetate. Behavior and Genetics, 1990, 20:499-509.	78
2.2.2.3. Données électrophysiologiques originales	79
2.3. Encodage bulbaire : aspects spatiaux	82
2.3.1 Anosmie partielle et activation bulbaire : Données anatomo-fonctionnelles	82
2.3.2 Article 8 : Royet, J.P., Sicard, G., Souchier, C. and Jourdan, F. Specificity of spatial patterns of glomerular activation in the mouse olfactory bulb: computer-assisted image analysis of 2-DG autoradiograms. Brain Res., 1987, 417, 1-11.	87
2.3.3. Article 9 : Sicard, G., Royet, J.P. and Jourdan, F. A comparative study of 2-deoxyglucose patterns of glomerular activation in the olfactory bulbs of C57 BL/6J and AKR/J mice. Brain Res., 1989, 481: 325-334.	87
3. Conclusion de la deuxième partie	88
TROISIEME PARTIE : DISCUSSION	89
1. Un espace nerveux pour encoder l'odeur	89
1.1. Entre topographie et fonction	90
1.2 Sélectivité des neurones olfactifs et spécificité des récepteurs	93
1.2.1. Interactions protéines- ligands	93
1.2.2. Sélectivité des récepteurs aux odeurs	95
1.2.3. Unicité ou multiplicité des récepteurs portés par un même neurone récepteur ?	97
1.3. Comment interpréter un déficit olfactif spécifique	98
2. De la réception olfactive à la perception de l'odeur	100
2.2. Article 10 : Sicard, G., Chastrette, M. Godinot, N. (1997). Des représentations de l'espace olfactif: Des récepteurs à la perception. Intellectica, 24:85-107.	100
3 Conclusion générale	101
BIBLIOGRAPHIE	103
RESUME DE LA THESE	120
LISTE DES PUBLICATIONS	122
ANNEXES : 10 ARTICLES	

PRESENTATION DE L'OUVRAGE

La transduction olfactive transforme l'énergie de l'interaction des molécules odorantes présentes dans l'environnement avec les neurones récepteurs du système olfactif en signaux nerveux et conditionne la mise en forme d'un message représentatif de l'odeur. Au cours de la dernière décennie, on a assisté au développement des études qui tentent, à l'échelle moléculaire, d'expliquer cette fonction des neurones récepteurs olfactifs. Ces tentatives reposent sur les progrès indéniables de la méthode électrophysiologique et des techniques de la biochimie. On découvre toujours aujourd'hui les événements membranaires et intracellulaires organisés en cascade qui réalisent la transduction olfactive. Notons déjà qu'ils apparaissent assez semblables à ceux qu'on rencontre chez d'autres types cellulaires impliqués dans d'autres fonctions (récepteurs hormonaux, photorécepteurs).

Mais, parmi ces événements, l'un reste encore secret : c'est la phase de réception de la molécule odorante. C'est cette phase qui détermine l'originalité de la transduction olfactive que nous voudrions mieux connaître.

Ainsi, avant que, destins communs de tous, mes travaux sur ce sujet, commencés il y a plus de quinze ans déjà, ne dégagent cette odeur sympathique et historique des expériences de Papa (Sicard, 1935), je les rapporte aujourd'hui. Je les ai inclus dans un bilan qui voudrait établir pour les nouvelles approches, les quelques enseignements que j'ai recueillis. Des provisions pour les nouveaux jours en somme!

Mon intention est d'abord de décrire et d'expliquer la *sélectivité des neurones récepteurs olfactifs*. J'entends par là le fait que *tous les neurones récepteurs ne sont pas identiquement sensibles à toutes les substances odorantes*. C'est sur cette propriété dépendante des mécanismes récepteurs que repose la formation de *messages* véhiculés et traités par le système olfactif et cette propriété fonde, finalement, chez un individu la *sensation d'odeur*.

J'ai distingué trois parties dans cet ouvrage.

La première partie est constituée d'un ensemble de données bibliographiques. Les deux suivantes sont plus directement articulées autour de mes propres contributions expérimentales ou théoriques:

L'étude des *propriétés de discrimination* des neurones récepteurs olfactifs a d'abord été abordée chez la grenouille par l'observation directe de leurs sensibilités aux substances odorantes (Duchamp et al., 1974; Revial et al., 1978,a,b). J'ai poursuivi, avec la bienveillance de mes prédécesseurs, ces travaux (Revial et al., 1982,1983; Sicard et Holley, 1984; Sicard, 1985) et j'en dresse un bilan au début de la deuxième partie de ce document.

J'y ai ajouté, humblement il est vrai, quelques éléments se rapportant à la sélectivité des neurones récepteurs chez le mammifère (Sicard, 1986). Les travaux que j'expose ensuite prolongent la réflexion sur les mécanismes de la réception olfactive et sur la mise en forme du message olfactif par le bulbe olfactif (Duchamp et Sicard, 1984). Le chemin original qu'elle a ensuite emprunté est le fruit de la constatation suivante : Les altérations expérimentales de la muqueuse olfactive provoquaient généralement des effets assez semblables pour des odeurs

différentes. Ces manipulations ne montraient donc pas d'effets très sélectifs. Ce manque de sélectivité caractérisait bien la sensibilité des neurones récepteurs, mais il signifiait aussi que les protocoles d'intervention qu'on pratiquait n'avaient qu'un faible pouvoir de résolution. En développant, sur un modèle animal, l'étude d'un déficit naturel de la perception olfactive réputé très sélectif, l'*anosmie partielle*, je tentais de surmonter cette difficulté (Royet et al., 1987 ; Sicard et al., 1989; Pourtier et Sicard, 1990).

La troisième partie, intitulée "Discussion", constitue, une mise au point essentielle. Pendant que nos travaux se déroulaient, des données captivantes étaient apportées par la biologie moléculaire. Cette partie est donc d'abord l'occasion de réexaminer à la lueur de ces données nouvelles nos propres résultats et de dégager notre conception actuelle du codage de l'odeur par le système olfactif. D'autre part, constatons que le terme "odeur" est un terme polysémique, l'odeur signifiant à la fois la perception olfactive que le sujet ressent, et la source odorante, le support objectif, moléculaire, de la sensation olfactive. Il existe, bien sûr, l'espace de l'appareil olfactif entre ces deux concepts (Sicard et al., 1997), ... et de la place pour de plusieurs disciplines des neurosciences modernes! Ne pas s'en préoccuper, c'était évacuer naïvement des questions riches qui, il est vrai, n'alertaient pas la curiosité des neurophysiologistes ou même des psychophysiciens, et que nous avons contribuées à faire émerger.

PREMIERE PARTIE: SUPPORTS NERVEUX ET MOLECULAIRES

Cette première partie rassemble d'abord des données histologiques et fonctionnelles qui caractérisent l'organe récepteur, *la muqueuse olfactive*, du système olfactif des vertébrés.

Au long des paragraphes suivants, j'insiste sur un ensemble de propriétés neurobiologiques des neurones récepteurs olfactifs, jusqu'à celles qui permettent de distinguer des catégories fonctionnelles de neurones récepteurs et qui nourriront notre réflexion. La description de certaines procédures expérimentales qui ont éclairé ces propriétés n'est pas seulement l'occasion de rapporter les résultats qu'elles ont produits; c'est aussi, parfois, le moyen d'envisager les questions auxquelles elles pourraient répondre, ou celles qu'elles laissent sans réponse.

J'ai rappelé ensuite, les différents signaux électrophysiologiques qu'on utilise pour caractériser l'activité des éléments nerveux qui composent cet organe. L'apparition d'une méthode, celle du patch clamp, a permis de détailler de multiples composantes électrophysiologiques concourant à la transduction sensorielle olfactive. La description s'enrichit enfin de données moléculaires, relatives, en particulier, aux éléments impliqués dans la réception et la transduction olfactives qui nous intéressent.

1. Description synthétique de la muqueuse olfactive des vertébrés

Chez les vertébrés supérieurs, la muqueuse olfactive, épithélium olfactif et *lamina propria* (ou sous-muqueuse), tapisse les parois d'une portion des voies respiratoires supérieures, anatomiquement plus ou moins tourmentées selon les espèces. Son organisation histologique et fonctionnelle paraît assez homogène dans l'ensemble des vertébrés. Aussi, je n'en donnerai d'abord qu'une description synthétique (Fig. 1).

L'épithélium olfactif, pseudo-stratifié et sécrétoire, est constitué de quatre types cellulaires principaux: Les cellules réceptrices olfactives, les cellules basales profondes, les cellules basales glomérulaires et les cellules de soutien. Des glandes localisées dans la sous-muqueuse, territoire vascularisé et innervé, participent à la sécrétion du mucus dont les surfaces olfactives sont recouvertes, grâce à des canaux excréteurs traversant l'épaisseur de l'épithélium.

1.1. Les cellules réceptrices olfactives

1.1.1. Une nature neuronale

La zone intermédiaire de l'épithélium olfactif est occupée par les noyaux serrés en plusieurs couches de petits corps cellulaires. La plupart de ces cellules sont bipolaires et de petite taille, leurs corps cellulaires ont un diamètre compris entre 5 et 7 μm . Elles se prolongent, d'une part, par une ramification fine axonale, d'un diamètre de 0,2 μm . Cet axone s'enfonce en direction de la sous-muqueuse, traverse la boîte crânienne, et s'étend jusqu'à l'un des glomérules olfactifs où il s'articule avec des neurones du bulbe olfactif. L'autre prolongement, la dendrite, ayant un diamètre de l'ordre du micromètre, fait protubérance à la face externe, nasale, de l'épithélium. Ces cellules expriment aussi sans ambiguïté des

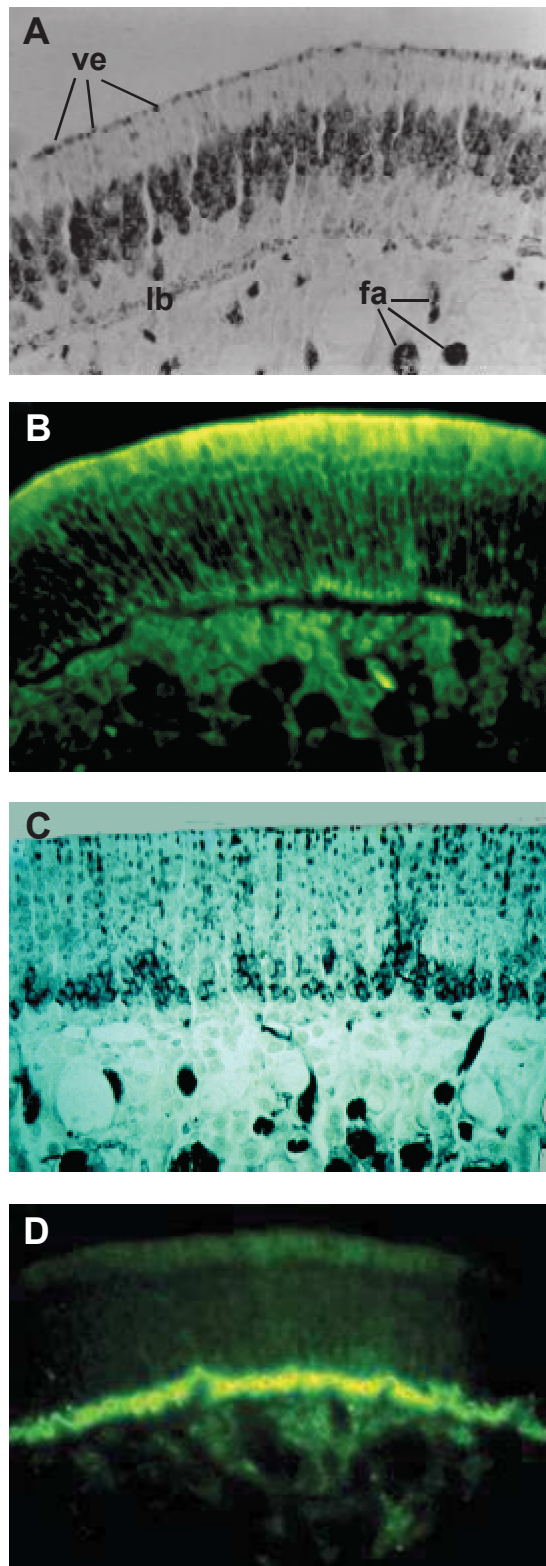


Figure 1: Localisation des différents types cellulaires de la muqueuse olfactive de rat. A- Les neurones olfactifs matures expriment l'*olfactory marker protein* et leurs corps cellulaires sont localisés dans la portion médiane de l'épithélium olfactif. On distingue à la surface de l'épithélium, des vésicules olfactives (ve) marquées alors que dans la sous-muqueuse, sous la lame basale (lb), les faisceaux d'axones (fa) sont aussi marqués. L'anti-OMP, nous a été gracieusement fourni par F. Margolis. B- Dans le tiers supérieur de l'épithélium, seules les dendrites des neurones récepteurs s'insinuent entre les corps cellulaires des cellules de soutien qui occupent presque tout l'espace, alors qu'en dessous, le volume est occupé majoritairement par les corps cellulaires des neurones matures, des cellules globulaires ou des cellules basales. Les cellules de soutien sont marquées par l'anticorps SUS-1 que Heamstead et Morgan nous ont donné. C- Les cellules globulaires, précurseurs des neurones sont marquées par un anticorps dirigé contre les N-CAM. D- Les cellules basales, ici marquées par un anticorps dirigé contre la kératine, forme une assise juste au-dessus de la lame basale. Sicard et Féron, données originales.

caractéristiques immunocytochimiques typiques de neurones, comme une énéolase ou des microtubules spécifiques du tissu nerveux, par exemple. En quittant le territoire épithélial, les axones des neurones récepteurs se rassemblent en faisceaux isolés par des cellules qui les engainent jusqu'aux structures bulbaires, avec une disposition plutôt caractéristique des nerfs en phase de développement. Ces cellules présentent des propriétés immunohistochimiques typiques des cellules de Schwann et des astrocytes conjointement, en particulier elles expriment la fibre protéique acide gliale GFAP et protéine S-100 (Gasser, 1956; Barber, 1982; Barber et Lindsay, 1982; Farbman et Squinto, 1985, Marin-Padilla et al., 1989; Barber et Dalh, 1987, Pixley, 1992; Astic et al., 1998). Leur capacité à favoriser la croissance axonale chez l'adulte, assurant le succès fonctionnel de la neurogénèse olfactive leur vaut l'attention des chercheurs qui s'intéressent à la réparation des axones médullaires (Ramon-Cueto et Nieto-Sampedro, 1993; Ramon-Cueto et al., 1998). Chaque faisceau comprend quelques dizaines de fibres. En se réunissant, ces multiples fibres amyéliniques forment plusieurs filets olfactifs. Ceux-ci pénètrent dans la boîte crânienne en franchissant la lame criblée de l'ethmoïde avant de constituer les nerfs olfactifs qui abordent les bulbes olfactifs par leur face rostrale. Ces fibres primaires se distribuent alors dans des zones de neuropile caractéristiques, les glomérules olfactifs, où elles s'articulent avec les cellules mitrales, les cellules à panache et les cellules périglomérulaires. Il n'y a pas de collatérale ou de synapse intermédiaire tout au long du trajet entre la muqueuse et les synapses glomérulaires.

Le neuromédiateur hypothétique (Sassoé-Pogneto et al, 1993), le glutamate, de ces neurones a récemment été confirmé grâce à l'étude du réseau bulbaire sur des tranches de bulbe olfactif de plusieurs espèces (Berkowicz et al., 1994, Bardoni et al., 1996, Chen et Shepherd, 1997).

Toutefois, selon Margolis et ses collaborateurs, plusieurs arguments sont en faveur d'un dipeptide, la L-carnosine (*beta*-alanine-L-histidine) (Ferriero et Margolis, 1975; Harding et Margolis, 1975; Brown et al., 1977; Burd et al., 1982, Rochel et Margolis, 1982; Halasz et Shepherd, 1983). On n'avait cependant jamais obtenu d'activation électrique du bulbe olfactif par application directe de carnosine (Tonosaki et Shibuya, 1979; MacLeod et Straughan, 1979; Frosch et Dichter, 1984), jusqu'à ce que Kanaki et al., 1997, montrent que l'application de carnosine sur la même préparation que celle ayant servi à confirmer le rôle du glutamate, évoque une réponse excitatrice des cellules post-synaptiques enregistrées. En fait, la carnosine est connue pour jouer le rôle de régulateur dans les synapses glutamatergiques et son rôle exact reste à préciser.

La dendrite du neurone récepteur, intercalée entre les cellules de soutien, forme, à sa partie apicale, une vésicule qui supporte des cils ou des microvillosités et est baignée par un mucus. L'espace muqueux et l'espace intercellulaires de l'épithélium sont séparés par des jonctions de type *zonulae occludens* situées à la partie la plus superficielle de l'épithélium alors que les contacts intercellulaires plus profonds sont stabilisés par des desmosomes (jonctions de type *zonulae adhaerens*). Ces jonctions sont perméables à de nombreuses substances chimiques, y compris à certaines molécules odorantes.

Sous la surface de l'épithélium, regroupées dans certaines zones, on a observé, rarement mais sans ambiguïté, des contacts entre les dendrites de neurones récepteurs, au travers d'épines (figure 2), sans qu'on sache, toutefois, en apprécier la valeur fonctionnelle (Graziadei, 1971; Graziadei et Metcalf, 1971; Breipohl et al., 1974; Rafols et Getchell, 1983). Ces contacts rendent cependant plausible l'échange d'informations entre les neurones récepteurs olfactifs voisins, et sont présents chez la plupart des animaux que Graziadei a étudié (communication personnelle). Cette observation n'a pas modifié la conception classique

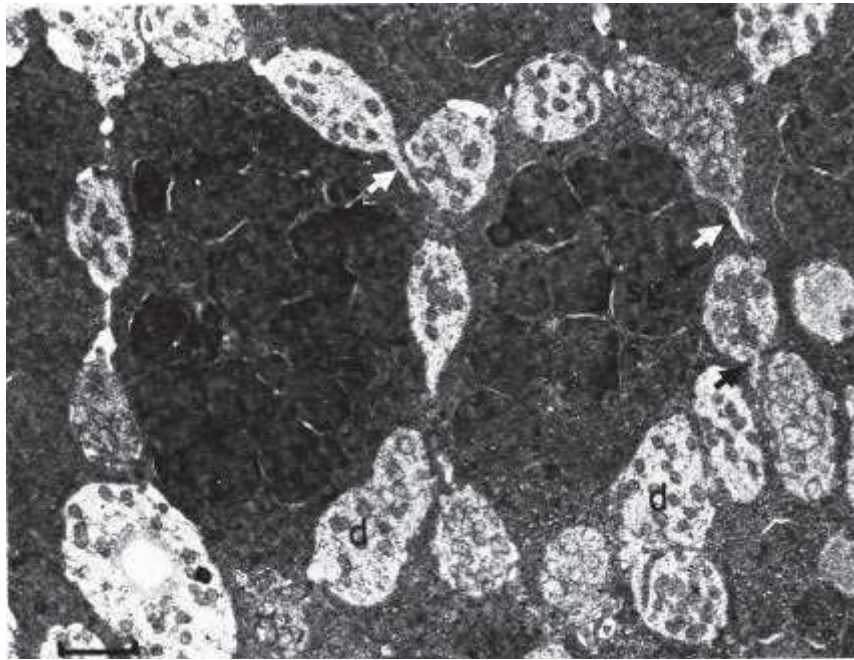


Figure 2: Vue en microscopie électronique d'une coupe parallèle à la surface de la muqueuse olfactive. Les dendrites, claires (d), des neurones récepteurs olfactifs disposés autour des corps cellulaires des cellules de soutien remplies de granules sécrétoires (sg), émettent parfois des épines qui semblent établir des contacts avec les dendrites voisines (flèches). Cette organisation a été vue chez la grenouille, le vautour et la tortue (D'après Graziadei, 1970).

selon laquelle les neurones récepteurs sont des canaux d'information qui fonctionnent de manière indépendante (Holley et MacLeod, 1977).

1.1.2. Les cils olfactifs, siège de la transduction olfactive

La membrane des cils olfactifs est le siège du mécanisme initial de la transduction olfactive, c'est à dire de la phase de couplage entre les molécules odorantes et les récepteurs aux odeurs. Le support biochimique primordial, la protéine réceptrice, est restée hypothétique jusqu'en 1991 alors que l'implication d'entités réceptrices dans la transduction olfactive était déjà supposée par Hopkins en 1926.

Les molécules odorantes dissoutes (ou transportées) dans le mucus peuvent interagir avec la membrane des neurones récepteurs olfactifs. Les cils mesurent entre 50µm chez le rat et 200µm chez la grenouille, leur diamètre étant de l'ordre de 0,3µm. Il est classique de noter que les cils que portent les neurones récepteurs olfactifs leur offrent une large surface d'adsorption ou de contact, multipliant par environ 30 la surface exposée de la vésicule olfactive (Menco, 1980). Ces cils forment, dans le mucus, un feutrage sur toute l'étendue des territoires olfactifs de la cavité nasale. On dénombre généralement moins d'une dizaine de cils par neurone récepteur chez la grenouille (Reese, 1965), leur nombre a été estimé à une centaine chez le chien (Okano et al., 1967). Ils sont régulièrement immobiles chez les mammifères (Lidow et Menco, 1984), mais certains neurones récepteurs, au moins chez les amphibiens, portent des cils qui battent sans synchronisation (Hopkins, 1926; Reese, 1965). Cette mobilité a été interprétée comme un critère d'immaturité des neurones récepteurs (Mair et al., 1982). Les caractéristiques ultrastructurales des cils sont en fait similaires pour d'autres types cellulaires, avec la présence et l'arrangement classique de paires de microtubules (Menco

et Farbman, 1985,a,b), munis de bras caractéristiques chez les espèces dont les cils olfactifs sont mobiles (Lidow et Menco, 1984).

Avant l'explosion de travaux sur la transduction olfactive de cette dernière décennie, de nombreux arguments indirects permettaient de situer les événements initiaux de la détection olfactive au niveau de la membrane de cils olfactifs,

- morphologiques (Kerjaschki et Horandner, 1976; Menco et al., 1976, 1980,a,b, Masson et al., 1977),
- électrophysiologiques (Ottoson, 1956; Ottoson et Shepherd, 1967; Getchell, 1977; Getchell et al., 1980; Juge et al., 1979,a,b; Bronstein et Minor, 1977; Trotier et MacLeod, 1983; Adamek et al., 1984)
- ou biochimiques (Gennings et al., 1977; Price, 1978; Pelosi et al., 1982; Rhein et Cagan, 1983; Fesenko et al., 1983, 1985, 1987, 1988; Chen et Lancet, 1984; Anholt et al., 1986, 1988; Sklar et al., 1986).

Voici quelques-uns de ces arguments.

Grâce à des cryo-fractures, on a observé des particules protéiques intra-membranaires dont la densité élevée dans la membrane des cils olfactifs, 1000 à 2500 unités par micromètre carré, contraste avec les densités plus faibles, 300 à 800, relevées pour les membranes ciliaires d'autres types cellulaires (Menco, 1980). Ces particules pourraient compter parmi elles les récepteurs de molécules odorantes (Masson, et al., 1977; Menco et al., 1976, 1980,a,b; Breipohl et al., 1982 Menco et al., 1997). Comparant la réactivité électrophysiologique des muqueuses olfactives de sujets témoins et de sujets affamés, Masson et al. ont observé que l'amplitude de la réponse électrique de la muqueuse olfactive à la stimulation est liée au nombre de ces particules (Masson et al., 1977).

Ottoson, en 1956, et Getchell, en 1977, ont observé que l'amplitude de la réponse électrophysiologique intégrée (EOG, *cf infra*) de la muqueuse olfactive à la stimulation olfactive, décroît d'autant plus que son point d'enregistrement est éloigné de la surface de la muqueuse: Ceci indiquerait la position apicale du générateur. Par ailleurs, la réactivité électrophysiologique aux odeurs de la muqueuse olfactive est liée à l'intégrité des cils olfactifs (Simmons et Getchell, 1981; Adamek et al., 1984). Plusieurs protéines membranaires ont été extraites de la muqueuse totale ou de cils olfactifs. Certaines d'entre elles pourraient bien être de véritables récepteurs de molécules odorantes. Leurs affinités pour les molécules odorantes se sont avérées comprises entre 10^{-5} et 10^{-10} M (Gennings et al., 1977; Price, 1978; Fesenko et al., 1983; Rhein et Cagan, 1983). Certaines fractions protéiques, lorsqu'on peut les inclure dans des membranes synthétiques, confèrent à ces membranes "reconstituées" une sensibilité aux odorants (Fesenko et al., 1977; Anholt et al., 1988, Labarca et al., 1988).

Les résultats des explorations biochimiques et électrophysiologiques moléculaires plus récentes ne laissent plus aucun doute sur cette localisation (Nakamura et Gold, 1987; Boekhoff et al., 1990; Firestein et al., 1991). En fait, on peut aujourd'hui produire un schéma de la transduction olfactive à l'échelle moléculaire probablement encore incomplet. Celui-ci comprend plusieurs entités associées aux cils olfactifs: les protéines réceptrices, les protéines G, les enzymes produisant les second messagers, les canaux ioniques contrôlés par les seconds messagers, et les divers éléments régulant les cascades enzymatiques de la transduction. Nous y reviendrons.

1.2. Les cellules basales

Les cellules basales sont disposées à proximité de la lame basale de l'épithélium. En fait il existe deux types cellulaires dans la portion basale de l'épithélium olfactif: des cellules les plus profondes, juxtaposées à la lamina propria, dites cellules basales horizontales ou cellules

sombres, et des cellules légèrement plus superficielles, dites cellules basales globulaires. Chez l'adulte, amphibien ou mammifère, on observe dans cette région des figures de mitose (Andres, 1966, Smart, 1971; Graziadei, 1973; Graziadei et Metcalf, 1971) et on a très tôt émis l'hypothèse que ces cellules constituaient un stock de précurseurs pour le renouvellement des neurones olfactifs récepteurs.

La position périphérique extrême de ces neurones les expose aux agressions de toutes sortes, chimiques (Brandt et al., 1990; Delaleu et Sicard, 1995), virales (Morales et al., 1988 ; Lafay et al., 1991) ou mécaniques (Sumner, 1964, Mott et Leopold, 1991) et les rend caduques (Stott et al., 1985; Miller et al., 1981,a,b; Bogdanffy et al., 1987; Barthold, 1988; Levin et al., 1985). Dans ces conditions, le maintien de la fonction olfactive est assuré par la prolifération et la différenciation des cellules basales, donc par une véritable neurogénèse. La permanence chez l'adulte de cette neurogénèse a d'abord été attestée par l'incorporation de thymidine tritiée dans l'ADN des cellules basales globulaires, manifestant donc la réplication des chromosomes lors de divisions cellulaires (Graziadei et Metcalf, 1971; Graziadei, 1973; Moulton, 1975; Mackay-Sim et Patel, 1984; Camara et Harding, 1984; Hinds et al., 1984).

Que le remplacement des neurones récepteurs détruits massivement et expérimentalement à partir des cellules basales soit efficace ne fait aucun doute, même chez les mammifères. Il s'accompagne d'une récupération fonctionnelle (Harding et al., 1978, Delaleu et Sicard, 1995, Genter et al., 1996). Cette propriété est bien entendu très étudiée puisqu'elle constitue un modèle rare pour l'étude de la régénération nerveuse chez le mammifère adulte. Relativement à notre préoccupation, l'encodage de l'odeur, cela pose la question du maintien de la représentation de l'odeur!

1.3. Les cellules de soutien

Les cellules de soutien s'étendent de la lame basale jusqu'à la lumière nasale. Elles insinuent des prolongements entre les corps cellulaires, les dendrites et les axones des neurones récepteurs olfactifs et isolent donc ces neurones les uns des autres (hormis dans les occasions déjà mentionnées). Dans certains cas, on observe que les dendrites des neurones récepteurs perforent les portions apicales des cellules de soutien au lieu d'avoir une disposition intercellulaire (Breipohl et al., 1974). Leur face profonde peut être en contact avec les cellules endothéliales des capillaires sanguins de la *lamina propria* ou avec les cellules des glandes de Bowman. Leur bordure nasale, libre, est garnie de microvillosités. Les observations histologiques ou électrophysiologiques montrent qu'il existe au moins deux types de cellules de soutien chez la salamandre (Rafols et Getchell, 1983; Masukawa et al., 1985; Trotier et MacLeod, 1986) ou chez le rat (Menco et Farbman, 1985), sans que l'on sache si elles représentent des fonctions différentes. Il est même possible de distinguer plusieurs types immunologiques (Carr et al., 1991). Des marqueurs immunologiques spécifiques des cellules de soutien ont été obtenus chez le rat (Hempstead et Morgan, 1985) et un anticorps monoclonal qui marque sélectivement les microvillosités de ces cellules a été récemment isolé (Pixley et al., 1997).

On note une particulière abondance de réticulum endoplasmique lisse dans la région supranucléaire de ces cellules (Farbman, 1992). La portion la plus superficielle contient des granules sécrétoires chargés de mucopolysaccharides acides et neutres (Duveau et Gerebtzoff, 1967; Rafols et Getchell, 1983; Getchell et al., 1984). On y trouve aussi divers pigments dont la vitamine A, du rétinol, des caroténoïdes ou autres (Briggs et Duncan, 1961; Kurihara, 1967). Par leur activité sécrétoire, ces cellules participent à la constitution du mucus (Getchell et al., 1984). Elles contribuent donc à la gestion de l'environnement ionique des neurones récepteurs en régulant principalement sa composante potassique perturbée par la stimulation olfactive (Okano et Takagi, 1974; Getchell, 1977; Rafols et Getchell, 1983; Trotier et Mac

Leod, 1986), ce qui est cohérent avec leur conductance membranaire potassique élevée, indépendante du potentiel trans-membranaire, et leur faible résistance d'entrée.

On a aussi émis l'hypothèse qu'elles puissent capter des odorants et les cataboliser. Grâce à des enzymes, appartenant par exemple aux systèmes à cytochrome P-450, elles contribueraient, à l'inactivation des stimulus olfactifs (Dalh et al., 1982, Zupko et al.; 1991, Getchell et al., 1993).

Ainsi, on prête aux cellules de soutien un rôle trophique de l'épithélium olfactif, une fonction d'isolant et une fonction sécrétoire, régulant l'environnement de la portion fonctionnelle des neurones récepteurs. Tout compte fait, on dispose encore de peu de données sur ces cellules.

1.4. Les glandes de la cavité nasale, le mucus et les protéines solubles de transport.

Les différentes formations glandulaires de l'épithélium nasal ont été répertoriées et on en a souligné les variations phylogénétiques (Bojsen-Moller, 1964). Toutes participent probablement à la constitution du mucus qui recouvre l'épithélium olfactif. Leurs sécrétions présentent une importante variété (Cuschieri et Bannister, 1974). Les glandes de Bowman sont spécifiquement associées au territoire olfactif, tandis que les glandes nasales latérales, plus largement distribuées dans la muqueuse nasale ont été aussi rattachées à la fonction olfactive bien que les preuves directes de leur implication manquent.

- Les glandes de Bowman, simples, tubulaires sont localisées sous l'épithélium olfactif, entre les faisceaux d'axones des cellules neuroréceptrices, dans la *lamina propria*. Leurs canaux sécrétoires traversent l'épaisseur de l'épithélium sus-jacent et s'ouvrent à la surface de celui-ci. Les marquages histochimiques montrent qu'elles contiennent des sulfo-mucines et des glyco-amino-glycanes. Dans la cavité nasale, la sécrétion d'hydrocarbonates soufrés semble restreinte aux seules glandes de Bowman (Cuschieri et Bannister, 1974). Ces mêmes glandes semblent sécréter des lipocalines (Lee et al., 1987)

- Les glandes nasales "latérales" largement distribuées dans les parois latérales mais aussi septales de la cavité olfactive chez le rat, forment un groupe proéminent surtout à l'avant de la cavité nasale. C'est, pour l'instant, là surtout qu'on localise des protéines solubles qui présentent une forte affinité pour certains odorants, appartenant à la famille des lipocalines (*Olfactory-binding protein*, OBP; Pelosi et al., 1982; Pevsner et al., 1986; Scalfari et al., 1997, Pes et al., 1998, Löbel et al., 1998).

- Parmi les glandes qui contribueraient à la constitution du mucus, il faut probablement ajouter encore, les glandes antérieures et postérieures du septum nasal; les glandes postérieures nasales situées à la jonction entre l'épithélium olfactif et l'épithélium respiratoire; les glandes du sinus maxillaire dont on distingue deux groupes, l'un dorsal, l'autre ventral; les cellules caliciformes de l'épithélium respiratoire.

Selon Morgan et al., (1986), le mucus nasal contient 97% d'eau, 2 à 3% de glycoprotéines mucoïdes, 0.3 à 0.5 % de lipides, 0.1 à 0.5% de protéines solubles. Ces dernières comprendraient 97% d'albumine et de 3% d'immunoglobulines.

Il existe des données relatives à la composition ionique du mucus (Bronstein et Leontiev, 1972; Joshi et al., 1987, Chui et al., 1987). Les valeurs parfois avancées et anormalement élevées de la concentration en ions potassiques traduisent vraisemblablement une contamination de la fraction étudiée par du potassium intracellulaire, due à une rupture intempestive des cils olfactifs lors de la mesure (Tab. 1).

Les capacités d'adsorption du mucus pour différents odorants sont variées (Hornung et Mozell, 1977) et distinctes de celles de l'eau (Hornung et al., 1987). C'est un facteur important

qui détermine l'efficacité des stimuli. Ces capacités de solvation distinctes selon les substances odorantes entraînent aussi le partage des odorants à la surface de la muqueuse olfactive. Cette propriété constitue le fondement de la théorie chromatographique de l'olfaction (Mozell, 1964, 1966). On a également observé que le temps de rétention des substances odorantes dans la muqueuse olfactive peut atteindre plusieurs minutes (Hornung et Mozell, 1977).

Parmi les protéines dissoutes dans le mucus, nous devons noter la présence de lipocalines dites OBP qui, hypothétiquement, pourraient favoriser le transport vers les sites récepteurs olfactifs des molécules peu hydrosolubles (Pevsner et al., 1986, 1988; Bignetti et al., 1987; Lee et al., 1987; Bianchet et al., 1996; Tegoni et al., 1996; Pes et al., 1998).

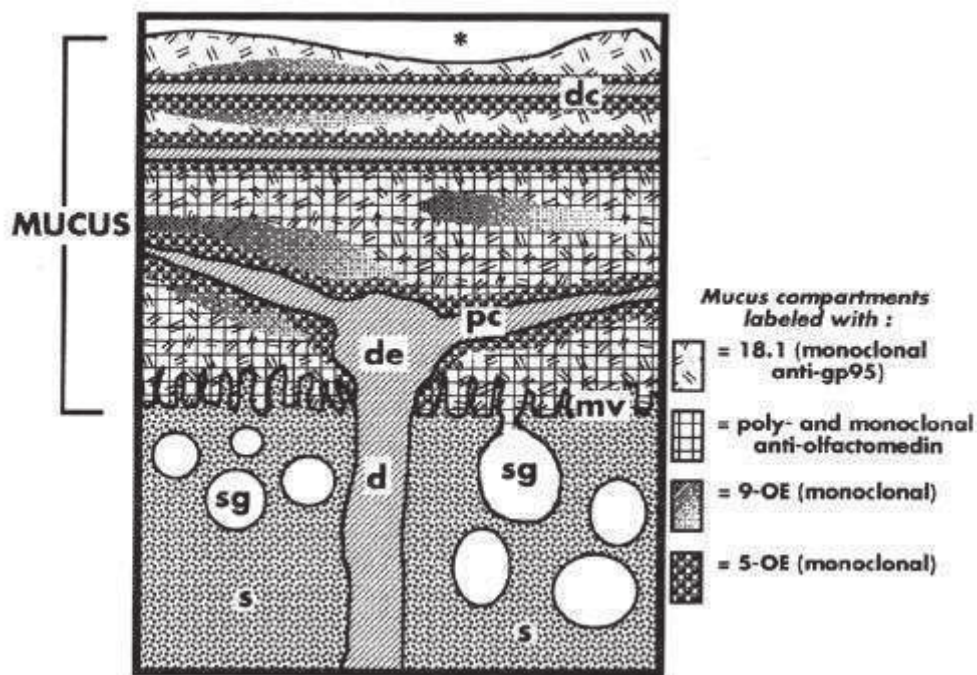


Figure 3: Mucus olfactif: Représentation schématique des quatre domaines mis en évidence par leurs caractéristiques immunospécifiques. Les granules sécrétoires (sg) sont marqués par quatre anticorps. Seules les superpositions des deux domaines les plus étendus, marqués par MAb18.1 ou l'anti-olfactomédine ont été indiquées. Il existe cependant une superposition entre ceux-ci et les domaines marqués par les anticorps monoclonaux 9-OE ou 5-OE, ou le domaine marqué simultanément par ces deux anticorps. L'astérisque indique la lumière nasale. d: dendrite de neurone récepteur; de: vésicule olfactive; pc: portion proximale du cil olfactif; dc: portion distale et fine du cil olfactif; s: cellule de soutien; mv: microvillosités. Cartouches: en haut 18.1 anticorps monoclonal anti-gp95; anticorps poly- et monoclonal anti-olfactomédine; anticorps monoclonal 9-OE; et enfin en bas anticorps monoclonal 5-OE (d'après Menco et Farbman, 1992). rem: En plus du marquage du mucus et des granules sécrétoires, les 2 derniers sont des marqueurs de N-CAM, le premier marque les cils olfactifs, comme l'anti-olfactomédine.

Table 1: Concentrations de cations (en mM) dans le mucus olfactif

Na+	K+	Ca2+	
104.6	69.6	-	grenouille Bronshtein et al., 1972
75.6	77.4	-	cobaye "
52.7	10.6	10.7	grenouille Joshi et al., 1987
85	11	10	crapaud Chiu et al., 1987

rem: Chiu et al., indiquent que la plus grande part du calcium est associée aux glycoprotéines du mucus; la concentration de cet ion libre serait de 0.32 mM

Dans le plasma, on rencontre une protéine de cette famille qui transporte le rétinol impliqué dans la vision (Lee et al., 1987). Rappelons qu'au niveau des neurones récepteurs de la vision, le rétinol, ou, plus exactement, l'un de ses métabolites, rend fonctionnelle par sa liaison une protéine réceptrice intervenant dans la transduction du stimulus lumineux en signal nerveux. On doit mentionner, parmi les arguments suggérant une implication de ces molécules dans la sensorialité olfactive des vertébrés, que l'efficacité de phéromones chez certains insectes est conditionnée par de telles protéines vectrices: Ces protéines transportent dans la phase muqueuse des sensilles olfactives, depuis les pores ciliaires jusqu'aux sites récepteurs, des substances phéromonales en les soustrayant à l'inactivation enzymatique (Vogt et Riddiford, 1981; Lerner et al., 1990). Une autre localisation des lipocalines est suggestive: On les trouve dans l'urine des souris, source d'informations sexuelles et spécifiques (Selway et Keverne, 1990; Keverne, 1998; Yamazaki et al., 1983)¹.

Des OBP ont été isolées chez plusieurs espèces (Fig. 4) Ces petites protéines assemblées en dimères, présentent des spécificités de liaison variées et larges. On sait, par exemple, que l'OBP1 du rat est saturable par la 2-isobutyl-3-methoxy-pyrazine, alors que l'OBP2 qui ne peut pas être saturé par ce même produit admet l'acide myristique comme ligand privilégié mais aussi d'autres acides gras ou aldéhydes aliphatiques de poids moléculaires voisins. L'OBP1 admet aussi pour ligands, la menthone, le citralva ou le lilial (Löbel et al., 1998). Ces données laissent présager que de telles molécules jouent un rôle important dans la discrimination olfactive, mais, hélas, l'exacte participation de ces protéines de transport dans la physiologie olfactive n'est toujours pas déterminée.

On a dosé également certaines activités enzymatiques associées aux cellules sécrétoires des muqueuses olfactives ou respiratoires (Cuschieri, 1974). Nous avons déjà mentionné qu'on a identifié des systèmes cytochrome P-450 dans les glandes de Bowman, les glandes latérales et les cellules de soutien (Dalh et al., 1982; Reed et al., 1986; Nef et al., 1989, Adams et al., 1991). Une carboxyl-estérase a été trouvée dans les canaux des cellules de Bowman, dans les cellules de ces glandes et dans les cellules de soutien (Bogdanffy et al., 1987). D'autres systèmes enzymatiques, impliqués dans le catabolisme de l'acide cyanhydrique ont été trouvés en concentration importante dans la muqueuse nasale (Dalh, 1989). La contribution réelle de ces activités enzymatiques à l'inactivation de la réaction olfactive reste malheureusement imprécise.

¹Chez des bactéries, les gènes codant pour les récepteurs protéiques qui sont engagés dans le chimiotactisme et interagissent avec des substances comme le maltose, le galactose, la sérine, etc, sont localisés dans des opérons qui codent aussi pour les systèmes de transport de molécules messages (Hazelbauer, 1988; Adler et Epstein, 1974; Lengeler, 1975)

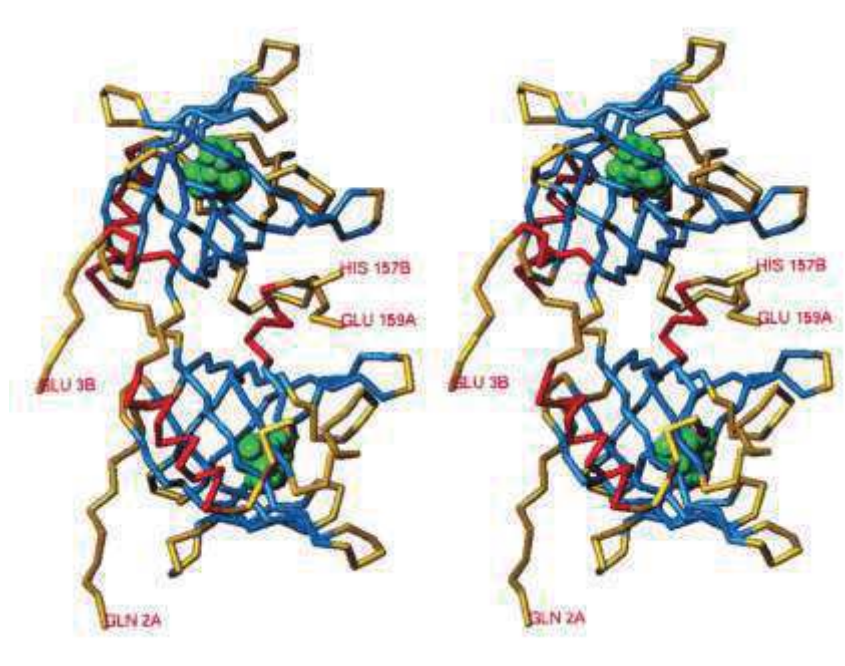


Figure 4: Vue stéréoscopique de la structure du dimère constituant une *olfactory binding protein* isolée chez un bovin. Les couleurs représentent différentes structures secondaires. En rouge, les hélices, en bleu, les feuillets β , et en jaune les autres structures. En vert, sont représentées des molécules inscrites dans des cavités enfouies dans la structure protéique qui pourraient être des sites de liaison de petites molécules lipophiles... Entre les deux monomères existe une autre cavité qui pourrait aussi servir de site de fixation pour des ligands semi-polaires ou chargés (D'après Tegoni et al., 1996)

L'activité sécrétoire de la muqueuse est accélérée par des vapeurs de substances, comme le chloroforme ou la pyridine, qu'on dit irritantes (Wesolowski, 1967; Okano et Takagi, 1974) mais elle est aussi influencée par des stimuli olfactifs classiquement utilisés comme le 1,8-cinéole (Joshi et al., 1987). Le contrôle *beta*-adrénergique de la sécrétion du mucus des glandes olfactives a été montré chez la salamandre (Getchell et Getchell, 1984a). L'augmentation de la sécrétion provoquée par l'administration de substances catécholaminergiques entraîne des modifications de la réponse électrophysiologique des neurones récepteurs aux stimulations olfactives.

En résumé, on doit considérer que le mucus participe au transport des molécules odorantes et à leur élimination par des réactions cataboliques. Il constitue certainement un environnement adapté au fonctionnement des neurones récepteurs. Nous soulignons que, tout compte fait, on connaît certainement trop peu de choses sur la solvation des odorants par le mucus ou sur l'affinité des odorants pour les protéines qu'on rencontre dans le mucus. Cette lacune se fait sentir, entre autre, chaque fois qu'on a besoin de comparer les efficacités stimulantes de plusieurs substances odorantes. On peut tenter d'expliquer, au moins en partie, la faible réactivité aux odorants rencontrée chez les neurones récepteurs isolés par l'absence de cette phase muqueuse dans les suspensions de cellules employées.

1.5. Les innervations extrinsèques

Ces innervations nous intéressent à deux titres: D'abord parce qu'elles peuvent moduler par divers processus la réactivité de la couche réceptrice du système olfactif. Parmi ces processus, soulignons d'abord la sécrétion de mucus, déjà envisagée, et la vasomotricité qui

régule le volume de la cavité nasale (Eccles et Lee, 1981; Eccles et al., 1988, 1989). Parmi les réactions à la stimulation trigéminal, il faut même compter les réflexes contractiles des narines qui interdisent l'accès du stimulus à l'organe sensible! Mais, elle nous intéresse aussi, parce que la perception olfactive est accompagnée, souvent, (indistinctement chez l'homme), d'informations provenant d'autres modalités sensorielles qu'il n'est pas toujours commode d'interdire.

De nombreuses études histologiques démontrent la présence de ramifications du nerf trijumeau et du nerf terminal dans la muqueuse nasale ou la muqueuse olfactive (Bojsen-Moller, 1975; Demski et Northcutt, 1983; DeLong et Getchell, 1987). Certaines terminaisons nerveuses s'étendent jusque dans la partie superficielle de l'épithélium olfactif tandis que d'autres limitent leur expansion à la sous muqueuse, souvent concentrées autour des capillaires sanguins ou des structures glandulaires. La nature sensorielle de certaines fibres du nerf terminal fait peu de doute, chez le poisson au moins (Desmski et Nortcutt, 1983). La réponse électrophysiologique des faisceaux de fibres trigéminales à la stimulation chimique des territoires olfactifs a été clairement établie (Tucker, 1971, Silver et Moulton, 1982; Silver et al., 1985, 1988). Mais, une large partie du plexus nerveux sous-épithélial, adrénérergique, noradrénérergique ou cholinérergique (Grote et al., 1975; Zielinski et al., 1989), exerce sur place ses influences. L'application locale d'agonistes adrénérergiques provoque une augmentation de la sécrétion muqueuse (Getchell et Getchell, 1984). Par ailleurs, la stimulation électrique du nerf trijumeau modifie l'activité des neurones récepteurs olfactifs (Bouvet et al., 1987).

Sur le plan neurochimique, on rencontre dans la muqueuse olfactive de nombreux neuromédiateurs ou neuromodulateurs, y compris une innervation peptidérergique.

On décrit des fibres à LHRH (luteizing hormone - releasing hormone) originaires du nerf terminal dans la partie profonde de la muqueuse olfactive (Jennes et Stumpf, 1986; Zheng et al., 1988). On les rencontre dans la paroi des vaisseaux sanguins et au contact de formations glandulaires de la muqueuse respiratoire. La sécrétion de LHRH dans ces vaisseaux pourrait participer au contrôle de leur vasomotricité, moduler l'activité des neurones récepteurs dont on connaît la sensibilité à d'autres peptides; elle pourrait influencer sur l'activité sécrétoire des glandes innervées (Bouvet et al., 1987). Egalement associées à l'organe vomero-nasal, les fibres à LHRH pourraient moduler l'entrée d'informations olfactives plus spécifiquement liées à la vie sexuelle.

On décrit des fibres à substance P qui s'étendent à la base de l'épithélium olfactif, à proximité de glandes de Bowman et des vaisseaux sanguins (Papka et Matulionis, 1983, Bouvet et al., 1987). Certaines affleurent la surface de la muqueuse. Ces fibres, originaires de la branche ophtalmique du nerf trijumeau, lorsqu'elles sont stimulées, modifient l'activité électrique des neurones récepteurs; ces effets sont aussi observés lors d'applications locales de substance P (Bouvet et al., 1984, 1987). Parce que la suppression de l'activité trigéminal par application de capsaïcine laisse subsister les comportements olfactivement guidés, on peut supposer que ces effets n'auraient qu'une influence modulatrice (Silver et al., 1985).

On décrit des fibres adrénérergiques, sympathiques et des faisceaux cholinérergiques, parasympathiques (Grote et al., 1975; Jourdan, 1984). Elles participent à l'innervation des vaisseaux sanguins et des glandes de Bowman dans la lamina propria. Comme nous l'avons déjà mentionné, une régulation catécholaminérergique de l'activité sécrétoire des glandes de Bowman a été démontrée (Getchell et Getchell, 1984).

Cette rapide énumération fait donc apparaître que plusieurs modalités sensorielles pourraient participer à la constitution de ce qu'on appelle la perception "olfactive" (Cain et Murphy, 1980). De fait, la contribution de la voie trigéminal, a été estimée au moyen d'arguments psychophysiques (Doty, 1975; Doty et al., 1978), ou neurophysiologiques (Tucker, 1971; Walker et al., 1979; Silver et Moulton, 1982; Silver et al., 1985; Silver et al.,

1988). Chimio-détection et, probablement, certaines capacités de discrimination subsistent même chez les sujets privés de capacités olfactives: L'acuité du système trigéminal reste cependant plus faible que celle du système olfactif (Mason et Silver, 1983; Doty et al., 1978; Silver et al., 1988). Par ailleurs, Stone et al., (1968) ont montré l'influence inhibitrice de la voie trigémينية sur la réactivité du bulbe olfactif.

Ces précisions prennent toute leur importance lorsqu'il s'agit d'apprécier des résultats d'études comportementales qui ne distinguent pas toujours ces modalités. On retiendra toutefois que, relativement à la voie olfactive, il faut des concentrations environ cent fois plus élevées pour stimuler la voie trigémينية (Doty, 1975).

1.6. Territoire de projection des neurones récepteurs: le bulbe olfactif

Parce que nous pensons que le message émis par une source ne peut être correctement apprécié que si l'on a quelque idée des propriétés de sa cible, nous envisageons ici, schématiquement, l'organisation du bulbe olfactif et ses liens avec l'épithélium olfactif.

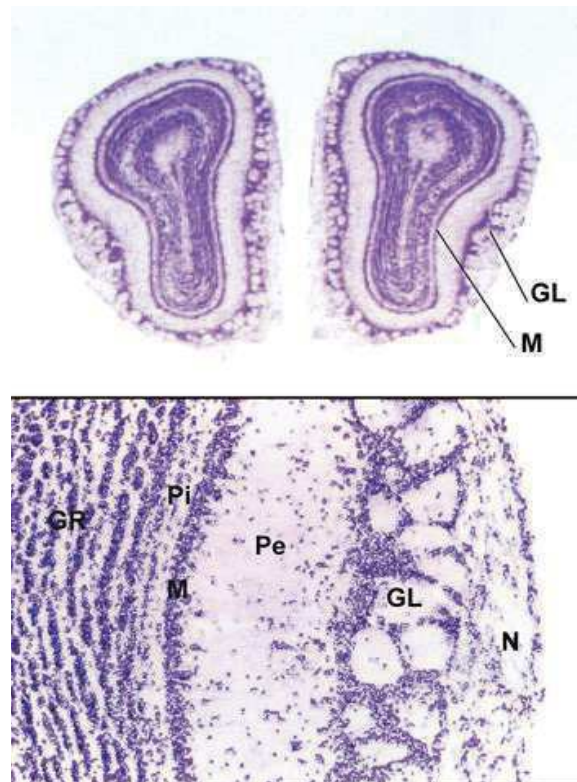


Figure 5: Coupe histologique transversale de bulbes olfactifs de souris vue globale et détails: GL, couche glomérulaire; Pe, couche plexiforme externe; M, couche des cellules mitrales; Pi, couche plexiforme interne; GR couche des cellules granulaires, N couche des nerfs. Sicard, donnée originale.

1.6.1. Organisation du bulbe olfactif

Il n'est pas dans notre intention de donner ici une description complète du bulbe olfactif. Quand bien même nous le voudrions, la littérature déjà abondante qui lui est consacrée ne suffit pas à lui donner un profil fonctionnel ou même histologique achevé.

Sommairement nous pouvons constater qu'il s'agit d'une structure stratifiée où l'on rencontre au moins six types fondamentaux de cellules nerveuses qu'on subdivise sur la base de données morphologiques parfois anciennes (Ramon y Cajal, 1955; Hoffman, 1963), mais aussi de données plus récentes, neurochimiques (Halasz et Shepherd, 1983) ou électrophysiologiques toujours plus détaillées.

C'est le bulbe olfactif des mammifères qu'on choisit de décrire synthétiquement, la description de celui des vertébrés inférieurs s'en déduisant par simplification, c'est-à-dire par élimination de strates selon Cajal (Ramon y Cajal, 1955). Il s'agit, le plus souvent, d'une structure paire. On dénombre dans chaque bulbe six couches nerveuses superposées, de la périphérie à la profondeur: 1) la couche des nerfs olfactifs, 2) la couche des glomérules olfactifs, 3) la couche plexiforme externe, 4) la couche des soma des cellules mitrales, 5) la couche plexiforme interne, 6) la couche des soma des cellules granulaires (Fig. 5).

Les deux nerfs olfactifs rejoignent chacun les formations bulbaires ipsilatérales, et cèdent progressivement d'avant en arrière les fibres qui forment la couche la plus superficielle de la structure bulbaire. On trouve des fibres croisées chez les vertébrés inférieurs exclusivement (Andriason et Leveteau, 1989, Hoffman, 1963, Ebbesson et al., 1987).

Les glomérules olfactifs constituent des structures ovoïdes typiques présentes chez tous les vertébrés. Chaque glomérule est une zone de neuropile bien individualisée, entourée de lames gliales et des corps cellulaires des cellules nerveuses périglomérulaires. S'y échangent des synapses entre les fibres primaires olfactives et les arborisations dendritiques des deutoneurones d'une part, cellules mitrales et cellules à panache, et d'interneurones d'autre part, les cellules périglomérulaires.

Les glomérules contiennent entièrement les arborisations terminales de nombreux axones de neurones récepteurs qui échangent des synapses avec les deutoneurones et les cellules périglomérulaires (Le Gros Clark, 1956; White, 1973). Remarquons qu'au contraire de l'arborisation dendritique de cellule mitrale, les terminaisons des fibres primaires issues d'un même filet olfactif, *a fortiori* la terminaison d'un neurone récepteur donné, n'envahiraient pas tout l'espace glomérulaire (Land et al., 1970; Land, 1973; Land et Shepherd, 1974). Cependant, les axones des neurones récepteurs donneraient de multiples contacts synaptiques, en passant, à plusieurs deutoneurones (Willey, 1973).

Les cellules périglomérulaires innervées par les neurones récepteurs, sont des interneurones inhibiteurs qui étendent leurs prolongements axonaux dans la couche glomérulaire. Elles semblent participer au réglage de l'excitabilité des deutoneurones: Leurs dendrites ramifiées dans un glomérule sont aussi en contact avec les deutoneurones. Leurs axones propagent leurs influences inhibitrices jusqu'aux glomérules voisins. Il existerait deux sous-classes neurochimiques de cellules périglomérulaires, l'une GABA-ergique l'autre dopaminergique (Halasz et al., 1977, 1978; Mugnairi et al., 1984).

Les deutoneurones sont multiples.² Leur distinction s'appuie sur leurs caractéristiques topographiques, morphologiques ou génétiques (Orona et al., 1984; Schneider et Macrides, 1978; Greer et Shepherd, 1982; Schoenfeld et al., 1985). Mais, en général, tous ont en commun une dendrite primaire qui s'épanouit à l'intérieur d'un glomérule olfactif et une arborisation dendritique secondaire qui s'étale tangentiellement et parfois très largement (sur plusieurs centimètres carrés chez le rat) dans la couche plexiforme externe où ce prolongement entre en contact, entre autre, avec les dendrites des cellules granulaires.

² Bien qu'au moins 2 fois plus nombreuses que les cellules mitrales la fonction ou plutôt les fonctions des cellules à panaches restent peu claires. Il est vrai que, contrastant avec le regroupement favorable en couche bien individualisée des soma de cellules mitrales, la dispersion des corps cellulaires des cellules à panache dans la couche plexiforme externe rend leur approche plus délicate.

La population de cellules à panache est elle-même hétérogène sur les plans morphologiques et neurochimiques (Halasz et al., 1977, 1978; Schneider et Macrides, 1982; Orona et al., 1984; Macrides et al., 1985). On peut distinguer, particulièrement, les cellules à panaches superficielles et des cellules à panaches profondes, certaines de ces dernières n'étant considérées que comme des cellules mitrales déplacées.

Les deutoneurones se distinguent aussi par leurs projections axonales. Celles des cellules mitrales se distribuent plus largement que celles des cellules à panaches dans les territoires extra-bulbaires. Par ailleurs, les cellules à panache participent à un échange d'information entre la face médiane et la face latérale du bulbe olfactif (Schoenfeld et al., 1985; Macrides et al., 1985). Les cellules à panache sont aussi impliquées dans les relations interbulbaires.

La couche nerveuse la plus profonde du bulbe olfactif contient les petits corps cellulaires des cellules granulaires. Il s'agit d'interneurones inhibiteurs GABA-ergiques dont on distingue plusieurs catégories morphologiques différenciées surtout par la position de leur corps cellulaires et des rameaux dendritiques dans la profondeur des couches (Ramon y Cajal, 1955; Orona et al., 1984; Schneider et Macrides, 1978; Schoenfeld et al., 1985; Mori et al., 1983). Ces cellules constituent un maillage complexe de boucles de rétroaction négatives qui modulent la sortie des deutoneurones (Duchamp-Viret et Duchamp, 1997).

D'autres interneurones de formes diverses et numériquement moins importants sont décrits: Les cellules Blanes, les cellules de Golgi, les cellules horizontales et verticales de Cajal, les cellules de Van Gehuchten et les cellules superficielles à axones courts. Ces dernières, par exemple, rendent encore plus complexe le contrôle de l'entrée des deutoneurones: Activatrices, elles reçoivent des synapses axo-dendritiques de la part des cellules périglomérulaires, de certaines cellules à panache ou d'autres cellules superficielles à axones courts. En retour, elles innervent les cellules périglomérulaires. Cette disposition laisse penser qu'elles modulent l'inhibition appliquée par les cellules périglomérulaires aux deutoneurones (Macrides et al., 1985).

Le rôle et les connexions de tous les neurones bulbaires n'ont cependant pas été précisés. Il est en particulier bien difficile de prévoir l'importance fonctionnelle d'extensions dendritiques qui s'inscrivent dans des volumes considérables (parfois presque un tiers de la couche plexiforme externe). Que sait-on, par exemple, des cellules dont le corps cellulaire de petite taille se trouve dans la couche plexiforme interne et qui sont connectées aux fibres primaires, signalées par Ramon y Cajal, (1955) et retrouvées par M. Flamand (communication personnelle).

Sans entrer plus avant dans le détail de ce qui est aujourd'hui connu, retenons que le réseau de neurones bulbaires supporte des boucles de rétroaction locales et donc des possibilités de mise en forme, de traitement de l'information (Holley et MacLeod, 1977; Scott et Harrison, 1987; Macrides et Davis, 1983; Schoenfeld et al., 1985). Les transmissions synaptiques intra-bulbaires mettent en oeuvre de très nombreux neurotransmetteurs et des neuropeptides (Halasz et Shepherd, 1983) dont on continue à faire l'inventaire. Ajoutons que la présence de fibres centrifuges provenant d'étages plus centraux du système nerveux complète ces possibilités d'intégration, modulant spécifiquement l'activité bulbaire en fonction des états internes (Pager et al., 1972, Chaput et Holley, 1976, Gervais et Pager, 1979,ab).

A la description du réseau en terme de connectivité cellulaire, on devra certainement ajouter des précisions sur ses caractéristiques temporelles. Cela dépasse notre propos, ici. Le message délivré par le bulbe olfactif est transmis par plusieurs types cellulaires à destination de

multiples structures centrales comme le cortex piriforme ou le thalamus. C'est, finalement, au travers de l'activité des deutoneurones, les variations spatio-temporelles de ce réseau mis en branle par la stimulation olfactive qui seront perçues par les étages nerveux encore plus centraux, innervés par les axones des cellules mitrales ou des cellules à panache.

1.6.2. Organisation des projections épithélio-bulbaires.

1.6.2.1 Données anatomiques et topographiques

Une importante caractéristique des projections des neurones récepteurs est leur rapport de convergence (**convergence numérique**) sur les deutoneurones. Selon Allison (1953), chez le lapin, il y aurait quelques dizaines de millions de neurones récepteurs projetant sur quelques deux mille glomérules. Chez le rat, le même nombre de glomérules serait la source d'information de 70 000 cellules mitrales et de 160 000 cellules à panaches (Meisami et Safari, 1981; Meisami, 1989, Royet et al., 1988). Les deutoneurones apparaissent donc entre cent et mille fois moins nombreux que les neurones récepteurs. L'une des questions cruciales qui conditionnent les règles de l'encodage de l'odeur est relative à la façon dont s'organisent les regroupements des fibres primaires qui innervent un glomérule donné (Graziadei et Monti-Graziadei, 1986).

A l'échelle anatomique, chez les mammifères ou chez les amphibiens, l'organisation des projections ne conserve que partiellement les relations topographiques périphériques (Le Gros Clark, 1951; Land, 1973; Greer et al, 1981; Costanzo et O'Connell, 1978; Dubois-Dauphin et al., 1981; Pedersen et al., 1986; Astic et Saucier, 1986; Saucier et Astic, 1986).

Chez le rat par exemple, Astic et Saucier ont observé les marquages rétrogrades de neurones récepteurs obtenus par la peroxydase de raifort injectée en des sites restreints de la couche glomérulaire. Ces auteurs ont constaté ainsi une tendance des fibres issues des régions médianes ou latérales et dorsales ou ventrales à converger vers des régions homothétiques bulbaires. Selon l'axe antéro-postérieur, la projection est beaucoup plus diffuse. Le détail de l'organisation des projections est finalement complexe. On a montré que des lésions localisées distinctes de la surface épithéliale, provoquent des figures de dégénérescence cellulaire dans de larges zones recouvrantes de la couche glomérulaire du bulbe olfactif (Land, 1973).

A l'échelle microscopique, on constate donc que chaque glomérule reçoit des fibres primaires de territoires anatomiquement étendus (*convergence topographique*) (Le Gros Clark, 1951; Land, 1973; Costanzo et Mozell, 1976; Dubois-Dauphin et al., 1981; Pedersen et al, 1986; Astic et Saucier, 1986). De plus, les données disponibles indiquent que des cellules contiguës de la muqueuse olfactive ont peu de chances de rejoindre des projections bulbaires contiguës. On constate donc aussi une *divergence topographique* des projections épithélio-bulbaires qui impose l'idée que les informations qui proviendraient d'une région restreinte de la périphérie seraient largement réparties dans la couche glomérulaire (Dubois-Dauphin et al., 1981; Greer et al, 1981).

On s'attendait donc à découvrir, surimposées à la projection régionale, des organisations d'une autre nature. Déjà, chez le lapin, Mori et al., (1985) indiquent qu'une sous-population immunologique de neurones récepteurs localisée dans la portion ventro-latérale de la cavité nasale se projette sur la portion ventro-latérale caudale des bulbes olfactifs. Le même groupe de chercheurs, après une exploration électrophysiologique des sensibilités des cellules des portions latérales et médianes du bulbe, ajoute qu'à de telles sous-populations pourraient correspondre des sélectivités particulières (Mori et al., 1990) Ces résultats ont été confirmés

récemment (Bozza et Kauer, 1998) et nous verrons ultérieurement que la connaissance des récepteurs éclaire plus rigoureusement les règles de la connectivité épithélio-bulbaire.

1.6.2.2. Données fonctionnelles

Les données sur l'organisation fonctionnelle des relations épithélio-bulbaires et la complexité du réseau nerveux intra-bulbaire rendent délicates les tentatives de modélisation des premières étapes du traitement de l'information olfactive.

Parce qu'elle a des implications fonctionnelles, la règle de convergence qui regroupe les terminaisons de milliers de neurones récepteurs dans un même glomérule est capitale: Seraient-ce des fibres partageant les mêmes propriétés intrinsèques qui se regrouperaient ou bien leur communauté supposée découlerait-elle de leur regroupement? La solution de cette énigme a avancé depuis que les récepteurs aux odeurs ont été découverts (voir § 3.1.3.2 Convergences bulbaires).

L'hypothèse d'un regroupement au niveau d'un glomérule de fibres de *même sensibilité* est séduisante (Le Gros Clark, 1956). Cette hypothèse a été défendue à la suite d'études électrophysiologiques de l'activité glomérulaire évoquée par la stimulation olfactive (Leveteau et Mac Leod, 1966), ou de l'utilisation du marqueur métabolique d'activité nerveuse, le 2-désoxy-glucose (Jourdan et al., 1980; Lancet et al., 1982; Benson et al., 1985; Kauer, 1987). Pour certains auteurs, c'est sur l'homogénéité des réactions à l'intérieur d'un glomérule donné et l'inégale réactivité des glomérules que s'appuie cette hypothèse (Leveteau et Mac Leod, 1966, Shepherd, 1985). Considérant le nombre de neurones récepteurs qui convergent sur un glomérule et le mode de distribution de leurs terminaisons dans cette structure, l'absence de régionalisation des réactions intraglomérulaires ne nous paraît pas un argument suffisant. D'ailleurs, l'observation fine de la répartition du marqueur d'activité métabolique au sein d'un glomérule a permis de la contester (Jourdan, 1984). L'hétérogénéité des réactions individuelles des glomérules paraît plus convaincante mais pourrait bien manifester d'autres organisations fonctionnelles comme l'ont montré Buonviso et Chaput (1990).

Nous soulignons toutefois qu'un regroupement systématique des fibres primaires de même sensibilité n'est nullement indispensable à la préservation de la discrimination des messages transmis par les deutoneurones. On constate d'ailleurs que les profils de sélectivité des deutoneurones ressemblent à ceux des neurones récepteurs et qu'ils pourraient donc n'être qu'une combinaison des profils de sélectivité des neurones récepteurs. Quoiqu'il en soit, nous savons qu'ils sont tels qu'un message discriminant peut toujours être transmis aux étages supérieurs.

En effet, comme pour les neurones récepteurs, il est possible de connaître la forme de l'information transmise par les deutoneurones grâce au recueil de leurs activités individuelles par les électrodes d'enregistrement unitaire (Kauer, 1974; Scott, 1977; Chaput et al., 1985, 1987; Doving, 1987). Nos propres expériences à la périphérie du système olfactif de grenouille se sont déroulées de concert avec celles d'André Duchamp qui, utilisant la même espèce animale et les mêmes stimuli que nous, a recueilli l'information à la sortie du bulbe olfactif (Duchamp, 1982). Nous présenterons donc, dans la deuxième partie, une comparaison de l'entrée et la sortie d'un étage d'intégration nerveuse olfactive (Duchamp et Sicard, 1984).

Finalement, nous retiendrons, pour l'instant, que la convergence numérique des fibres primaires est un dispositif favorable à l'amplification du message périphérique (Leveteau et Mac Leod, 1966; Holley et Doving, 1977; Van Drongelen, 1978; Van Drongelen et al., 1978). La divergence topographique des projections a été interprétée comme liée aux performances de détection du système plutôt qu'à ses capacités de discrimination (Astic et Saucier, 1986).

2. Données neurobiologiques et fonctionnelles complémentaires

2.1. La maturation des neurorécepteurs olfactifs

La maturation des neurorécepteurs olfactifs s'accompagne de variations biochimiques qu'on peut suivre au moyen de marqueurs divers. Parmi ceux-ci rappelons les marqueurs immunologiques tels que ceux que nous avons déjà mentionnés mais aussi des protéines comme l'OMP (*olfactory marker protein*) spécifique des neurones matures du tissu olfactif et apparaissant après la formation de la synapse avec les deutoneurones (Farbman et Margolis, 1980).

Nos informations sur l'évolution de la sensibilité des neurorécepteurs aux odorants au cours de l'ontogénèse proviennent d'une expérience réalisée au cours du développement ontogénétique de la muqueuse de rat. On y peut ajouter les observations multiples entreprises pendant la phase de neurogénèse qui suit la lésion expérimentale de la muqueuse ou du nerf olfactif (Simmons et Getchell, 1981; Adamek et al., 1984; Masukawa et al., 1985).

Nous avons déjà précisé qu'il a été établi, après controverse (Shibuya, 1964) que la sensibilité des neurorécepteurs aux stimuli olfactifs (jugée au travers de leur activité électrophysiologique) nécessite vraisemblablement que les cils olfactifs soient formés (Getchell et al., 1980; Mair et al., 1982; Adamek et al., 1984).

Chez le rat à l'état de fœtus ou de nouveau-né, Gesteland et ses collaborateurs (Gesteland et al., 1982) ont enregistré extracellulairement l'activité électrique de neurones olfactifs en réponse à une collection d'odeurs. Les enregistrements ont été réalisés sur des préparations d'âges différents, s'échelonnant du 12^{ième} jour de vie embryonnaire jusqu'au 14^{ième} jour post-natal.

Les connections entre les fibres primaires et les deutoneurones s'établissent vraisemblablement au cours du 18^{ième} jour de vie fœtale (Farbman et Margolis, 1980). La réponse locale de la muqueuse olfactive électro-olfactogramme n'est détectable qu'au 14^{ième} jour de vie embryonnaire mais existe ainsi avant qu'une information ne puisse être transmise au bulbe olfactif puisqu'il n'y a pas alors de connexion épithélio-bulbaire. Des potentiels de pointe n'ont pu être recueillis qu'à compter du 16^{ième} jour de vie embryonnaire. Les auteurs montrent que la sélectivité des neurorécepteurs olfactifs croît brusquement au 19^{ième} jour de vie embryonnaire, c'est-à-dire à partir du moment où les premiers contacts entre les fibres primaires et les deutoneurones du système olfactif sont établis. Cette étude suggère donc une maturation fonctionnelle du neurorécepteur liée à la mise en place de sa synapse avec le deutoneurone.

Ces résultats, importants, n'ont pas jusqu'ici été confirmés. Cependant, Menco et Farbman, (1985a,b) étudiant la genèse des cils olfactifs du rat, montrent un parallélisme suggestif entre la maturation ultrastructurale des neurorécepteurs et l'évolution des propriétés électrophysiologiques de la muqueuse olfactive. Au 14^{ième} jour de la vie embryonnaire, ils ne distinguent à la face apicale des neurorécepteurs que des cils primaires, un par cellule, alors que les premiers cils secondaires, multiples et caractéristiques de la maturité, apparaissent au 16^{ième} jour. Le pourcentage de neurorécepteurs non sélectifs décroît donc en raison inverse du pourcentage de cellules porteuses de cils secondaires.

D'autres études ont été menées sur des épithéliums olfactifs en phase de régénération après lésions, chez des amphibiens (Lidow et al., 1986, 1987; Simmons et Getchell, 1981; Adamek et al., 1984; Mair et al., 1982). Nous noterons que les conditions d'observation ne sont pas strictement identiques à celle rencontrées lors de la mise en place ontogénétique de cet organe. En particulier, une organisation bulbaire préexiste. De plus, on n'a jamais observé, chez les vertébrés adultes, les neurorécepteurs immatures caractérisés par le cil primaire

unique (Menco et Farbman, 1985,b). Sur ces épithéliums en phase de régénération, Simmons et Getchell, confrontant les observations histologiques et les propriétés électrophysiologiques des neurorécepteurs olfactifs enregistrés extracellulairement (Simmons et Getchell, 1981), n'ont décelé ni évolution ni différence de propriétés, activité spontanée ou sélectivité, entre les cellules de la population naissante et les cellules de la population témoin. De même, Lidow et ses collaborateurs n'ont pas, non plus, observé de stade de régénération pendant lequel les neurorécepteurs de grenouille auraient manifesté une absence de sélectivité semblable à celle observée chez le fœtus de rat (Lidow et al.,1987).

Ces données nous laissent donc penser que la maturation ontogénétique et celle qui a lieu en cas de remplacement chez l'animal adulte pourraient être des phénomènes différents. Elles attirent notre attention sur le fait que des neurorécepteurs d'âges différents pourraient manifester des sélectivités différentes.

2.2 Le renouvellement des neurorécepteurs olfactifs

C'est en constatant la récupération après lésion du nerf olfactif que l'on prend conscience de l'intérêt de cette neurogénèse. Les cellules qui ont capté la thymidine tritiée sont distribuées de façon hétérogène et composent une sorte de mosaïque de marquages (Graziadei et al., 1979) ce qui laisse penser qu'un petit groupe de cellules voisines sont simultanément dans une même phase de maturation. Ces résultats ont été confirmés et étendus grâce à l'insertion dans le génome d'un marqueur viral qui ne laisse plus de doute sur la filiation entre les cellules globulaires et les neurones olfactifs. (Caggiano et al., 1994). L'isolement et la mise en culture des cellules globulaires confirment aussi que ces cellules sont bien des précurseurs neuronaux (Pixley, 1992; Féron et al., 1999). Quant à la filiation entre les cellules basales profondes et les cellules basales globulaires, elle reste hypothétique.

Les caractéristiques quantitatives du renouvellement sont difficiles à cerner et dépendent probablement des conditions d'élevage des animaux. La durée de vie moyenne des neurones récepteurs chez la souris a été estimée à environ 30 jours (Graziadei et al., 1979; Moulton, 1975). Cependant, Hinds et al. (1984) montrent qu'il subsiste des neurones récepteurs matures radioactifs, 12 mois après une injection de thymidine tritiée. Ces derniers auteurs considèrent que les cellules qui régénèrent n'évoluent pas toutes jusqu'à l'état de neurones récepteurs matures. Un faible nombre d'entre elles établiraient un contact synaptique avec les cellules bulbaires et pourraient, dès lors, persister longtemps en l'absence de rhinites ou autres agressions destructrices de l'épithélium récepteur.

Nous avons déjà établi que, bien que les cellules matures pouvaient apparemment survivre longtemps (Hinds et al, 1984), les cellules basales remplacent, en permanence, une fraction de la population des neurorécepteurs (Graziadei et Metcalf, 1971; Kristensson et Olsson, 1971; Graziadei, 1973; Moulton, 1975). On doit considérer les conséquences d'un tel renouvellement de la population de neurorécepteurs.

On ignore quel est le retentissement de ces modifications sur le message nerveux et la façon dont est assurée la permanence de sa signification. On peut supposer que, du fait de la faible importance quantitative des cellules en renouvellement, l'information apportée par la multitude des canaux qui restent efficaces préserve le message. Cependant, les transformations perpétuelles que subit la population de neurorécepteurs pourraient être accompagnées de mécanismes conservateurs des propriétés de sélectivité de l'ensemble des individus. Cette proposition est un corollaire de la suivante: Les fibres qui régénèrent forment de nouveaux contacts synaptiques avec les deutoneurones. Ce phénomène, non géré, pourrait, à la longue, entraîner une profonde modification de l'image bulbaire. Dans le cadre de l'hypothèse d'un

codage spatial, cela laisse penser que les nouvelles projections pourraient être guidées. Toutefois, d'autres alternatives sont envisageables, impliquant toutes une plasticité adaptative et organisatrice des réseaux bulbaires. En fait, la connaissance nouvelle des récepteurs aux odeurs et des règles d'organisation des projections épithélio-bulbaires permettent d'envisager que c'est au niveau bulbaire, plus protégé, que se situe la "mémoire" du système (Wang et al, 1998).

Les mêmes questions se posent lorsqu'on considère la production *de novo* de neurorécepteurs qui suit les lésions massives physiques ou chimiques de la muqueuse olfactive (Graziadei et Monti-Graziadei, 1980; Camara et Harding, 1984). La section des nerfs olfactifs est suivie de multiples changements structuraux (Graziadei et Monti-Graziadei, 1980; Matulionis, 1975; Harding et al., 1977) biochimiques, (Harding et Margolis, 1975; Harding et al., 1977, 1978; Moran et al., 1977; Rochel et Margolis, 1980), électrophysiologiques (Takagi et al., 1969; Simmons et Getchell, 1981; Simmons et al., 1981; Adamek et al., 1984) qui marquent une phase de dégénérescence rétrograde et une phase de régénération. Les délais et l'efficacité fonctionnelle de la régénération qui suit dépendent de l'importance de l'atteinte originelle.

Conséquence d'un autre ordre, méthodologique, à un instant donné, la muqueuse olfactive est constituée de neurorécepteurs en développement, matures, ou sénescents. Nous avons signalé plus haut que l'hypothèse qu'à différents âges les neurorécepteurs puissent avoir des propriétés différentes a été émise (Gesteland et al., 1982). Or, les conditions d'enregistrements extracellulaires de l'activité des neurorécepteurs olfactifs dans une muqueuse olfactive indemne ne permettent pas, *a priori*, de savoir si on sélectionne, fortuitement, l'un ou l'autre de ces âges. On devra donc tenir compte de cette remarque pour critiquer les propriétés des neurorécepteurs olfactifs que nous mentionnerons (ou que d'autres ont rapportées). Dans la mesure où certains neurones qui émettent des potentiels de pointe pourraient ne pas être connectés au réseau bulbaire, cette remarque vaut également pour l'appréciation du message olfactif périphérique.

2.3 Sensibilité électrophysiologiques aux stimulations chimiques

Dans la muqueuse olfactive, on enregistre plusieurs types de signaux électrophysiologiques, chacun offrant la possibilité d'étudier des propriétés fonctionnelles différentes et ayant donc son utilité particulière pour l'expérimentateur. Ils permettent de distinguer l'activité locale du neurone récepteur, son potentiel générateur, et les signaux transmis par l'axone sous forme de potentiels d'action. Depuis peu, ils donnent aussi la possibilité d'analyser les propriétés des canaux ioniques de la membrane des neurorécepteurs olfactifs.

2.3.1. L'électro-olfactogramme (EOG)

Il s'agit d'un signal électrophysiologique lent enregistré au moyen d'une dérivation transépithéliale (Fig. 6): A la suite d'une stimulation olfactive brève de l'épithélium chimiosensible, on enregistre en surface de la muqueuse olfactive une réponse électrique généralement monophasique et négative qui a été nommée électro-olfactogramme (Ottoson, 1956). Cette réponse disparaît à la suite d'une section des nerfs olfactifs et réapparaît plus tard, ses évolutions étant concomitantes des phases de dégénérescence et de régénération des fibres olfactives primaires. Elle est formée principalement par une somme de courants récepteurs qui manifestent l'excitation de nombreux neurorécepteurs. En étudiant les effets des modifications

expérimentales de la composition ionique du mucus olfactif, on a montré que l'EOG est associé à des déplacements ioniques, Na^+ et K^+ , et que Ca^{2+} apparaît comme un cofacteur nécessaire de la réaction olfactive (Takagi et al., 1968; Tucker et Shibuya, 1965; Suzuki, 1978; Yoshii et Kawamura, 1983; Levetau et al., 1989). L'amplitude maximum de la réponse EOG est grossièrement proportionnelle à la concentration du stimulus qui l'évoque. Curieusement, on s'est peu intéressé à la relation entre l'amplitude de la réponse EOG et le nombre ou l'intensité des réponses unitaires qu'elle représente.

Le nombre d'éléments nerveux, plusieurs milliers habituellement, qui participent à la réponse EOG, varie en fonction des caractéristiques géométriques de l'électrode d'enregistrement. Il est aussi possible de réduire la constante d'espace en recouvrant la muqueuse d'une solution désodée et saccharosée (Tucker et Shibuya, 1965; Daval et al., 1970), pour finalement enregistrer l'activité intégrée de quelques centaines de cellules.

L'aspect classique de l'onde lente, son allure monophasique, est parfois mis en défaut:

- Certains odorants délivrés durant des temps brefs, comme le chloroforme par exemple, font apparaître une première phase positive. De multiples explications ont été proposées, incluant la possibilité, aujourd'hui réfutée, d'un artéfact électrochimique (Ottoson, 1956), l'expression d'un potentiel inhibiteur (Gesteland, 1964) ou de signaux accompagnant l'activité sécrétoire accrue des cellules de soutien (Takagi et al., 1969).

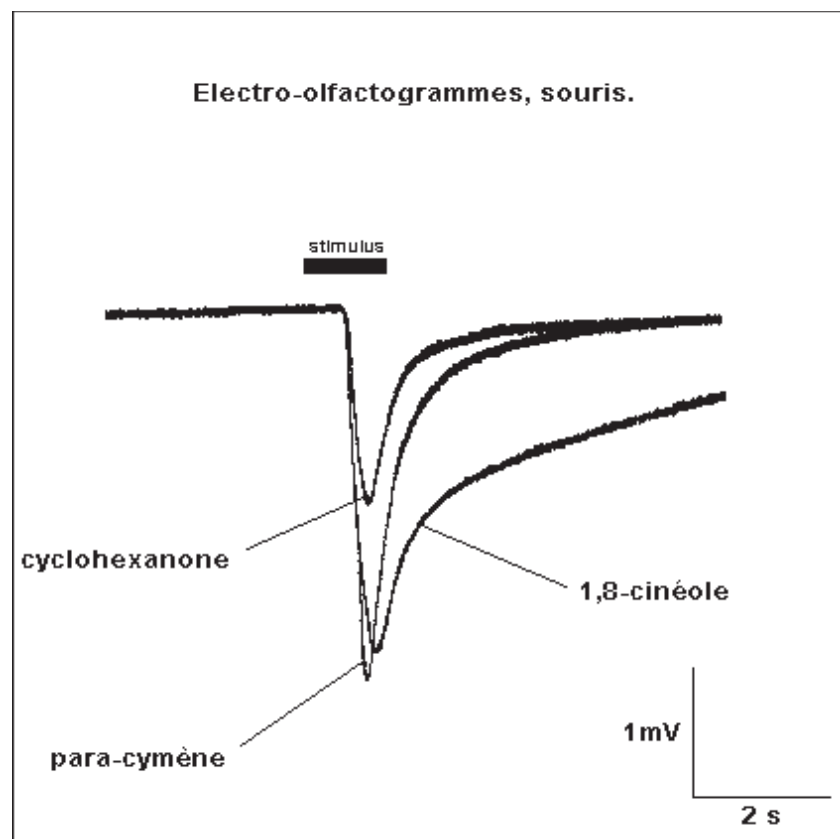


Figure 6: Exemple de réponses EOG enregistrées chez la souris. Ces quelques exemples permettent de constater que le dérouls des EOG contient une information caractéristique de la nature du stimulus. Sicard, donnée originale.

Notons que cette dernière hypothèse appelle la pluralité des phénomènes englobés par la réponse EOG et l'origine extra-nerveuse de la composante positive a été étayée par le fait

qu'après section du nerf olfactif une réponse positive aux solvants subsiste (Takagi et al., 1969).

- Les stimulations prolongées à concentrations constantes évoquent des réponses biphasiques, composée d'une réponse phasique et suivie d'un plateau tonique de plus faible amplitude, peu adapté. Par ailleurs, les stimulations brèves répétées avec un rythme de quelques secondes évoquent des réponses d'amplitudes décroissantes, sans extinction cependant (Ottoson, 1956).

2.3.2. L'activité unitaire des neurorécepteurs olfactifs

2.3.2.1. L'enregistrement intracellulaire et les courants ioniques

Les enregistrements de l'activité transmembranaire par empalement des neurones récepteurs avec des microélectrodes classiques, intracellulaires, ont été difficiles à réaliser du fait de la faible taille des cellules olfactives (Getchell, 1977; Suzuki, 1977; Trotier et MacLeod, 1983; Masukawa et al., 1985). Ils ont permis cependant d'observer le potentiel générateur de ces cellules sensorielles in situ et les potentiels d'actions transmis. On a aussi pu relever les caractéristiques suivantes:

Au repos, le potentiel de membrane est stable et se situe entre 30 mV et 65 mV. La résistance d'entrée serait supérieure à 100 megohms. On peut dépolariser la cellule par l'application de faibles courants (Hedlund et al., 1987). Les potentiels d'actions apparaissent sur des dépolarisations membranaires. Les membranes du neurorécepteurs présentent une résistance linéaire sous potentiels imposés hyperpolarisants et une rectification sous potentiels imposés dépolarisants. La résistance membranaire est abaissée lors de la réponse au stimulus olfactif, ce qui manifeste l'ouverture de canaux transmembranaires.

L'ensemble de ces données a pu être confirmé au moyen d'électrodes de patch clamp (Trotier, 1986; Firestein et Werblin, 1987, Maue et Dionne, 1987). Cependant, en particulier, la résistance membranaire est plus importante encore que ne le laissait prévoir les études intracellulaires: Elle serait plutôt de l'ordre de 3 à 6 gigaohms. Ainsi, en injectant un courant de 3 à 5 pA seulement, on peut évoquer un potentiel d'action (Trotier, 1986; Firestein et al., 1987).

On a très tôt identifié une collection de canaux ioniques soit directement sur les cellules isolées (Trotier, 1986; Firestein et Werblin, 1987; Maue et Dionne, 1987; Schild et al., 1989), soit sur des cils olfactifs (Nakamura et Gold, 1987) soit encore sur des reconstructions membranaires (Getchell, 1988, Yoshii et al. 1989; Vodyanov et Murphy, 1983; Labarca et al., 1988; Anholt, 1988).

- Ceux contrôlant l'entrée de sodium: transitoires et résistants à la tétrodothéine, sensibles au cobalt mais probablement inhibés par l'application d'amiloride (Frings et Lindemann et al., 1989).

- Ceux contrôlant les mouvements du calcium: entrants, et soutenus (Schild, 1989).

- Ceux contrôlant les courants potassiques sortants:

- calcium dépendants de 80 pS (Maue et Dionne, 1987);

- calcium dépendants de 130 pS (Maue et Dionne, 1987), probablement similaires à un canal obtenu à partir de cils olfactifs (Jorquera et al., 1995);

- potentiel-dépendants de 40 pS, à inactivation rapide.

- Celui contrôlant un courant potassique entrant et rectifiant de 25 pS (Maue et Dionne, 1987);

- Ceux contrôlant les mouvements des ions chlore (Trotier, 1986; Labarca et al., 1988; Kleene et Gesteland, 1991).

- Ceux sélectifs des cations Na^+ et K^+ , ayant des temps d'ouverture d'une milliseconde et plusieurs états de conductance à des intervalles de 35 pS, directement sensibles à des concentrations nanomolaires de certains odorants (Labarca et al., 1988).
- Et celui primordial dans la réponse aux odeurs, sélectif des cations Na^+ et Ca^{2+} (Nakamura et Gold, 1987).

2.3.2.2. L'enregistrement extracellulaire: recueil de l'activité transmise

Bien avant qu'on aboutisse à ces impressionnantes précisions, et grâce principalement à l'utilisation de microélectrodes métalliques extracellulaires, il a été possible de recueillir les potentiels de pointe émis par des neurorécepteurs olfactifs soumis à la stimulation olfactive. Parce qu'elle est plus propice que la méthode intracellulaire à des contacts de longue durée avec les neurorécepteurs olfactifs, nous avons utilisé la méthode extracellulaire au cours de nos propres travaux, chez la grenouille comme chez la souris. Cette méthode permet d'interroger individuellement les neurorécepteurs, de révéler la sensibilité de ces cellules à plusieurs stimulations olfactives et, finalement, de déduire la forme temporelle et spatiale du message nerveux transmis par le nerf olfactif.

Au repos, chez la grenouille, le neurorécepteur émet de manière sporadique des potentiels de pointe d'une durée généralement supérieure à 5ms. Cette activité apparaît, en moyenne, assez stable sur des périodes allant jusqu'à plus d'une heure. Chez la grenouille, à 13°C, l'activité moyenne de repos se situe entre zéro et une centaine de potentiels de pointe par minute. La sensibilité à la stimulation olfactive apparaît comme une augmentation transitoire du rythme d'émission de potentiel de pointe (Fig. 7). Les réponses à fréquences élevées s'accompagnent souvent d'effondrements radués et réversibles de l'amplitude du potentiel de pointe (réponses dites "décrémentielles").

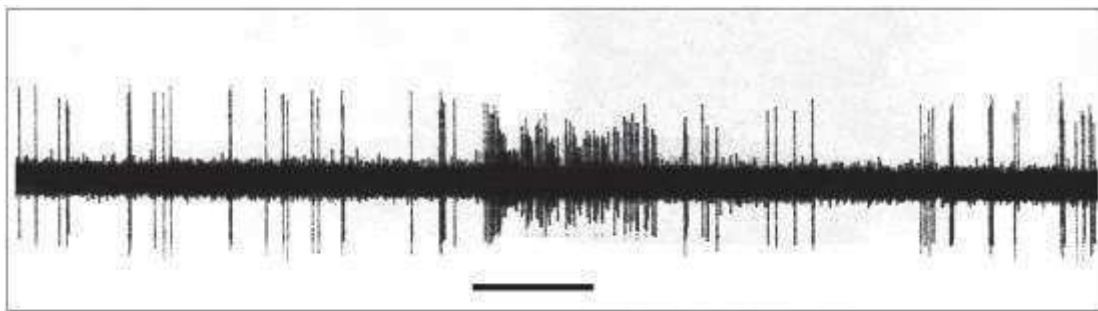


Figure 7: Exemple de réponse de neurorécepteur olfactif de souris. Le neurone est contacté par l'intermédiaire d'une électrode métallique extracellulaire plongée dans la muqueuse olfactive exposée d'une souris anesthésiée à l'équithésine. Sicard, donnée originale.

Le nombre des potentiels émis à la suite de la stimulation ne croit pas systématiquement en fonction de la concentration du stimulus (Holley et Doving, 1977). Aussi, on choisit habituellement de représenter les réponses des cellules aux odorants par la fréquence maximum atteinte au cours de la réponse qui, elle, est bien une fonction croissante de la concentration du stimulus. Les maxima relevés chez la grenouille à 13°C avoisinent 1200 P.A./min. Les potentiels de pointe que nous avons enregistrés chez la souris sont à la fois plus courts et atteignent des fréquences beaucoup plus élevées.

La réponse au seuil de sensibilité se manifeste par une émission de potentiels de pointe dont la probabilité d'apparition répond à une loi de Poisson. Compte tenu d'une activité de repos non nulle et sporadique, cette caractéristique ne facilite pas l'identification des réponses au seuil. Ces réponses ne sont d'ailleurs, en principe, identifiables qu'à la suite de répétitions des stimulations (Van Drongelen et al., 1978b). On peut donc considérer que l'utilisation de la fréquence d'émission de potentiel de pointe comme critère de sensibilité conduit à une sous-estimation du nombre de cellules sensibles à un stimulus donné. Le fait d'imposer des stimulations de fortes intensités, ce qui vise à saturer les systèmes récepteurs, était censé réduire l'importance relative de ce type d'erreur systématique.

2.4 Modifications expérimentales de la sensibilité de la périphérie du système olfactif.

2.4.1. Destruction de la couche réceptrice par des agents physiques ou chimiques

A la suite de chocs, les filets nerveux olfactifs qui criblent l'ethmoïde peuvent être rompus. Il s'ensuit une perte de la fonction olfactive (Moran et al., 1985, Levin et al., 1985). Comme nous l'avons déjà dit, des lésions chirurgicales du nerf olfactif chez de nombreuses espèces animales ont été réalisées pour étudier la régénération des neurorécepteurs et divers aspects des relations muqueuse-bulbe. On peut imaginer une exploration systématique des effets de lésions partielles qui perturbent l'organisation spatiale du message olfactif périphérique et pourraient donc avoir des conséquences observables sur les capacités de discrimination des animaux lésés.

En dehors de ces atteintes traumatiques, plusieurs types de traitements appliqués à la muqueuse olfactive peuvent abaisser sa sensibilité aux substances odorantes:

On peut, par exemple, citer l'irradiation nucléaire (Carmichael et al., 1984; Ophir et al., 1988) ou les instillations intra-nasales de solutions toxiques. Leurs effets ne sont généralement pas spécifiques: les sensibilités à toutes les substances odorantes sont simultanément affectées. Ces traitements, dans des conditions ménagées, ne détruisent que les neurorécepteurs olfactifs et laissent intactes les cellules basales. Nous avons déjà noté qu'à partir de ces dernières, on assiste, après l'arrêt du traitement, à une régénération de l'épithélium olfactif (Fig. 8) et à une récupération, au moins partielle, de la fonction olfactive (Harding et al., 1978, Harding et Wright, 1979; Schmidt et al., 1984; Lidow et al., 1987; Simmons et Getchell, 1981, Delaleu et Sicard, 1995).

Ainsi, il est possible d'agir expérimentalement, *in vivo*, sur les propriétés de l'organe récepteur du système olfactif au moyen de substances chimiques. Le sulfate de zinc est communément utilisé pour réaliser une lésion large de la muqueuse olfactive. Il semble qu'il soit difficile d'atteindre la totalité des territoires olfactifs par ces méthodes. (Meredith et O'Connel, 1988). On a aussi utilisé des antimétabolites, des détergents, des réactifs des protéines...

Une lésion provoquée par application de $ZnSO_4$ suivie d'une phase de régénération puis d'une administration prolongée d'un antimétabolite (hydroxyl-urée) permet d'obtenir, après arrêt du traitement, une population de neurorécepteurs à évolution synchronisée (Lidow et al., 1986). Parce qu'elle supprime les incertitudes relatives à la diversité des états de maturation que nous avons déjà mentionnée, cette procédure astucieuse a permis d'étudier, chez la grenouille, l'évolution des propriétés des neurorécepteurs au cours de leur régénération (Lidow et al., 1987).

2.4.2 Manipulations sélectives de la sensibilité aux odorants

D'autres expériences ont tenté de mettre en évidence des effets différentiels de traitements chimiques de la muqueuse olfactive (Mason et Morton, 1984, Mason et al., 1984) ou de protéger de manière sélective la sensibilité à un type d'odorant vis-à-vis de tels traitements (Getchell et Gesteland, 1972).

Certaines de ces expériences utilisaient des réactifs des protéines comme le N-éthyl maleimide, le Mersalyl, l'acide chloromercure-benzoïque ou de glycoprotéines comme la concanavaline A. La variable olfactive mesurée était l'amplitude maximum de l'EOG.

L'atteinte de la sensibilité à toutes les substances odorantes provoquée par l'application de Mersalyl sur la muqueuse olfactive est faiblement différentielle. Appliqué à une concentration milli-molaire avant et pendant le traitement inactivant, l'acétate d'amyle exerce un effet protecteur pour l'acide n-butyrique, l'acétate de butyle, le phénylacétaldéhyde, et le cinéole mais n'a pas d'effet sur la réponse au 1-butanol, l'acétate de benzyle ou de linalyle, nitrobenzène, la β -ionone (Menevse et al., 1978). Cependant, selon la même équipe, aucun effet protecteur différentiel de l'acétate d'amyle, de la carvone ou du decanal appliqués à des concentrations de l'ordre de 20 μ M n'a pu être décelé (Shirley et al., 1983). Les auteurs ont donc finalement conclu que le traitement de la muqueuse olfactive par le Mersalyl conduit à des effets non directement liés à la spécificité des sites récepteurs.

La spécificité de l'effet inactivant de la concanavaline A, d'abord limitée aux acides gras à chaîne courte, n'a pas été confirmée (Shirley et al., 1983; 1987; Wood et al., 1983).

Signalons cependant un cas où une spécificité plus marquée a été rapportée: L'application de substances odorantes photoactivables et l'irradiation par les rayons ultraviolets concomitantes réduisent toutes, mais différemment, les réponses EOG à des stimulations olfactives variées (Delaleu et al., 1983). La molécule photoactivable étant le phényl-azide, l'altération des réponses aux composés à noyau aromatique comme l'anisole ou le nitrobenzène était clairement plus importante que celle obtenue pour le cinéole ou pour le camphre. Ce phénomène pouvait alors être interprété comme le fait de blocage de multiples sites avec lesquels interagit le phényl-azide photoactivé. Certains d'entre eux seraient particulièrement touchés: ceux qui sont normalement engagés dans la détection olfactive de cette substance et dont on suppose raisonnablement qu'ils auraient une bonne affinité pour des molécules à noyau aromatique.

2.4.3 Adaptation croisée

Des informations complémentaires des précédentes ont été apportées par les expériences d'adaptation croisée. Il s'agit là d'une approche délicate mais particulièrement élégante. Plusieurs protocoles ont été suivis. Tous consistent d'abord à délivrer des odorants successivement dans un intervalle de temps limité à quelques secondes.

Ces stimulations olfactives ont été appliquées:

- aux sujets humains et on leur a demandé de préciser leurs sensations (Koster, 1971).
- à la muqueuse de salamandre, et on a recueilli la réponse unitaire des neurorécepteurs olfactifs (Baylin et Moulton, 1979)
- à la muqueuse de grenouille ou de carpe, et on a recueilli une onde bulbaire évoquée (Ohno et al., 1984; 1985).

Les résultats obtenus sont assez cohérents. Tous les auteurs signalent que la première stimulation altère, en général, tout ou partie de la réponse à la deuxième stimulation. Ceci est vrai que la nature des deux stimulus successifs soit changée ou non (auto-adaptation dans ce

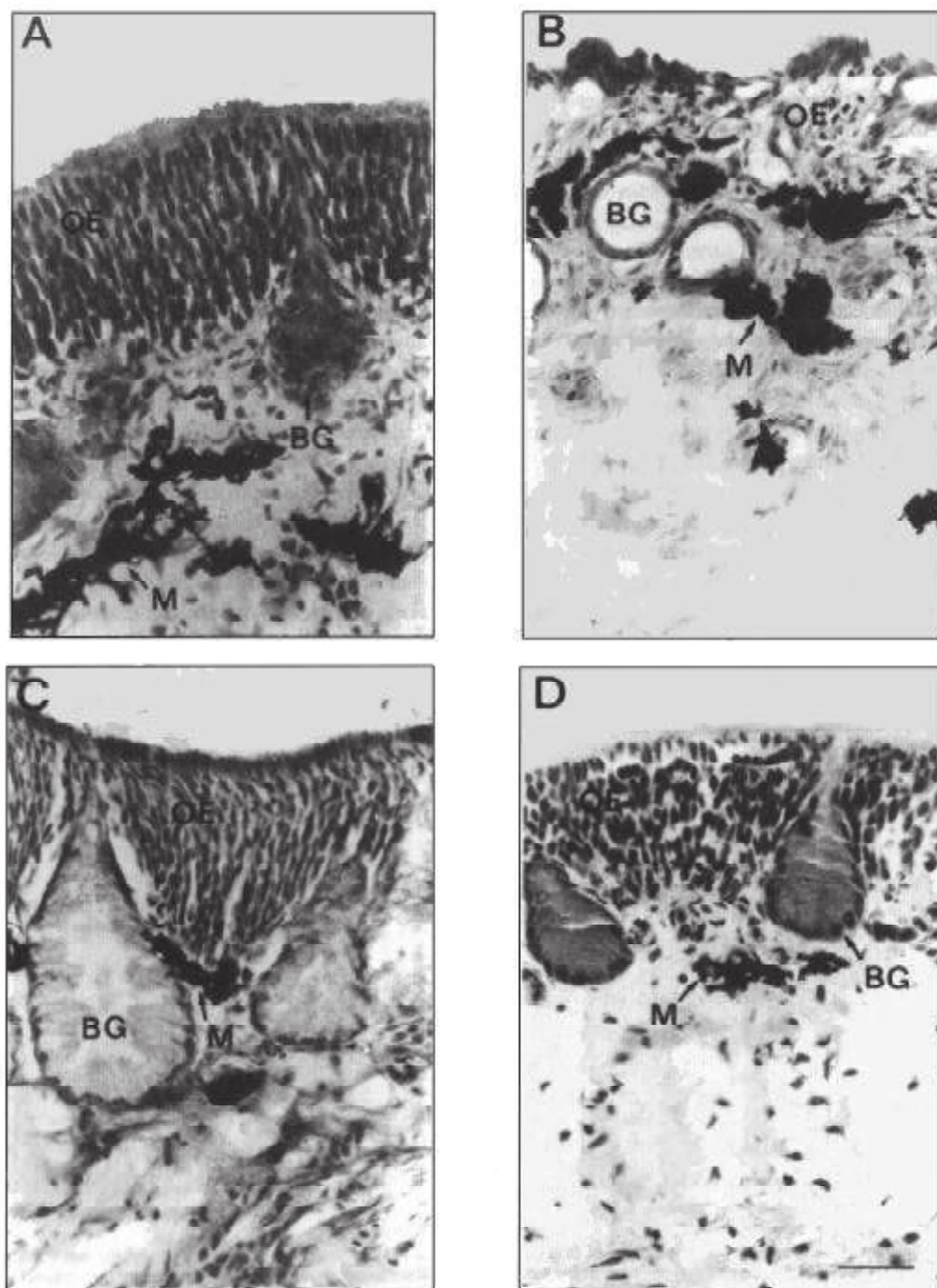


Figure 8: Destruction sélective de la muqueuse olfactive par une injection intrapéritonéale de Dichlobenil chez la grenouille. A- Coupe histologique témoin de la muqueuse olfactive de grenouille. B- Résultat de l'injection (50mg/kg) de dichlobenil (2,6 dichlorobenzonitrile): Quatre jours après l'injection, on observe la destruction massive de l'épithélium olfactif. On note que les glandes de Bowman sont transformées. L'atteinte est exclusivement localisée à la muqueuse olfactive. C- Une injection préalable de métyrapone supprime l'effet destructeur du dichlobenil, ce qui démontre la participation d'un système cytochrome P450 dans cette toxicité sélective. D- Après une récupération de quatre vingt dix jours, la muqueuse olfactive retrouve son aspect original et nous avons montré qu'elle réagissait normalement à la stimulation chimique. GB: Glandes de Bowman, M: Mélanine. Barre: 60µm. D'après Delaleu et Sicard, 1995.

cas). Koster comme Baylin remarquent que l'adaptation est rarement symétrique, c'est à dire que le stimulus qui altère la réponse à l'autre ne voit pas systématiquement sa propre réponse altérée par l'autre lorsque l'ordre des stimulations est inversé. Par contre, Onho et al. rapportent une belle symétrie des adaptations. Cette contradiction est probablement due à la sensibilité différente des méthodes, mises en oeuvre à des niveaux différents, pour recueillir les réponses du système olfactif. Ces données sont, finalement, interprétées comme l'indication que des substances odorantes partagent certains récepteurs avec des affinités inégales. Parce que les affinités relatives des stimulus pour ces sites sont différentes ou parce qu'un stimulus donné peut réagir avec plus de sites différents que l'autre, l'adaptation croisée n'est pas toujours symétrique.

Une approche voisine a été pratiquée par Bell et al. (1987). Elle est fondée sur l'utilisation d'un mélange binaire d'odorants. Dans un rapport audacieux, les effets, chez le sujet humain, de masquage d'un des composés odorants par l'autre ont été rapprochés des observations de l'activité glomérulaire que ce même mélange évoque chez le rat. Les auteurs remarquent que les résultats sont cohérents avec l'idée que les espèces moléculaires du mélange entrent en compétition pour les mêmes sites récepteurs.

2.5. Variations régionales de la sensibilité de la muqueuse olfactive

De façon répétée et chez différentes espèces, à l'aide d'enregistrement de l'EOG, on a montré l'hétérogénéité spatiale de la sensibilité de la muqueuse olfactive.

Non spécifique, elle correspond d'abord aux changements locaux de densité en neurorécepteurs. Cependant, en comparant les amplitudes d'EOG évoqués par de multiples substances odorantes à celle correspondant à un stimulus de référence, on a observé que ces variations spatiales étaient aussi spécifiques de la nature des stimuli (Daval et al., 1970, Mustaparta, 1971; Thommesen et Döving, 1977; Mackay-Sim et al., 1982; Edwards et al., 1988). Ainsi, en utilisant des séries de stimulus, on a réussi à évaluer leur similitude d'action sur la muqueuse (Daval et al., 1970). Par exemple, on a remarqué que le nitrobenzène et le benzaldéhyde, deux produits sentant l'amande amère, évoquent des réponses dont les amplitudes varient parallèlement sur toute l'étendue de la muqueuse olfactive. Ces observations donnaient une base expérimentale à l'hypothèse d'un code spatial de l'odeur et ont été confirmées et détaillées récemment (Ezeh et al., 1995). Elles sont renforcées par les données biochimiques obtenues à partir de muqueuse olfactive de chien (Dreesen et Koch, 1982), et cohérentes avec les données apportées par la biologie moléculaire (cf plus loin).

Envisageant cette hypothèse, Moulton (1976) indiqua que des odorants différents pouvaient recruter les réponses de régions distinctes de la muqueuse olfactive sous l'effet de 2 phénomènes: S'appuyant sur l'adsorption différentielle des substances odorantes par le mucus, le premier conduit à une mise en forme imposée du message périphérique. Selon le deuxième processus, la mise en forme serait inhérente aux particularités de la distribution de neurorécepteurs de même sensibilité sur l'étendue de la muqueuse olfactive. L'utilisation de sources d'odeur quasi ponctuelles a confirmé que la deuxième hypothèse pouvait à elle seule expliquer les variations sélectives régionales de la sensibilité aux odeurs (Kubie et al., 1980; Mackay-Sim et al., 1982, Ezeh et al., 1995, Scott et al. 1996). Jusqu'à il y a peu, il n'y avait pas d'explicitation de l'organisation qui réglerait les distributions différenciées des sélectivités et dont on devrait retrouver une trace à l'échelle unitaire.

L'évaluation de la pertinence de cette régionalisation reste à faire. Elle demanderait d'estimer l'effet de lésions localisées de la muqueuse sur les capacités de reconnaissance des odeurs.

2.6. Des catégories de neurones récepteurs olfactifs?

Bien évidemment, la question de la catégorisation des neurorécepteurs occupe une position centrale dans notre étude. Comme nous allons le voir, il existe plusieurs manières de l'envisager. Dans chaque cas, nous serions bien heureux de découvrir qu'aux catégories de neurorécepteurs décrites correspondent des propriétés de sélectivité particulières. Il semble que ce soit parfois le cas.

2.6.1. Hétérogénéité morphologique

Comme je l'ai déjà souligné, les neurorécepteurs peuvent porter soit des cils soit des microvillosités. Ainsi on distingue au moins deux types morphologiques de neurorécepteurs dont les proportions varient selon les espèces. (Reese et Brightman; 1970, Holl, 1973; Theisen et al., 1980; Thommesen, 1982; Reese, 1965; Graziadei, 1973; Simmons et Getchell, 1981; Jourdan, 1975; Rowley et al., 1989).¹

On a émis l'hypothèse qu'à cette distinction de forme correspondent des sensibilités chimiques différentes.

Chez les Salmonidés où les types morphologiques sont distribués distinctement, Thommesen (1982) a montré leurs différences de sensibilités vis-à-vis de certains stimulus odorants. Les neurorécepteurs à microvillosités sont apparus particulièrement sensibles aux acides aminés, solubles dans l'eau. Compte tenu de leurs propriétés solvatantes différentes, le milieu aérien et le milieu aqueux ne véhiculent pas identiquement les mêmes messagers olfactifs. Il est donc tentant de penser que les catégories morphologiques différentes pourraient correspondre à des solutions adaptatives (Vinnikov, 1982; Weiss et Altner, 1984) répondant à des modes de vie différents, terrestres ou aquatiques. Cette idée est globalement cohérente avec la répartition des deux types classiques selon les phylums. Mais on ne dispose pas d'information sur les propriétés chimio-réceptrices des neurorécepteurs à microvillosités chez les mammifères.

2.6.2. Hétérogénéité chimique

2.6.2.1. Marqueurs immunologiques

Depuis quelques années, l'identification immunohistochimique des neurorécepteurs montre la réalité d'une partition des neurorécepteurs sur la base de leur équipement de surface en glyco-protéines.

L'immunoréactivité de ces neurones permet, parfois en effet, d'en distinguer plusieurs sous-ensembles sans qu'on en comprenne toujours leur signification fonctionnelle (Astic et al., 1989; Allen et Akeson, 1985,ab; Hempstead et Morgan, 1985; Fujita et al., 1985; Mori, 1987; Mori et al., 1985; Schwob et Gottlieb, 1986; Schwarting et Crandall, 1991). Les antigènes repérés marquent généralement tout le neurorécepteur y compris son arborisation glomérulaire. Dans certains cas, les catégories révélées projettent topographiquement leurs axones sur le bulbe olfactif. La partition se fait le plus souvent selon l'axe médio-latéral.

¹ On notera que les cellules à microvillosités de la muqueuse olfactive ont reçu des descriptions variées, et qu'elles représentent plusieurs classes de cellules. Il persiste une certaine confusion. Dans tous les cas, leurs rôles restent imprécis. C'est la présence d'axones et le marquage rétrograde par la peroxydase injectée dans le bulbe qui atteste de la nature neuronale de certaines d'entre elles au moins. Chez le rat, des cellules à microvillosités sans prolongement axonal tardent à se mettre en place lors de la régénération suivant la lésion de la muqueuse olfactive., et l'étude de la récupération fonctionnelle n'a pas montré de déficit spécifiquement imputable à ce type cellulaire (Miller et al., 1995).

D'autres fois, on a écrit que ces distinctions immunohistochimiques pouvaient être interprétées soit comme significatives d'un état de maturité, soit comme jouant un rôle dans l'établissement des connections avec le deutoneurone au cours de l'ontogénèse du système olfactif (Astic et al., 1989). Mori a indiqué que les cellules appartenant à des territoires bulbaires correspondant à des projections immunologiquement différenciées présenteraient des sélectivités différentes (Mori et al., 1990).

Parmi les distinctions immunologiques les mieux documentées, on peut mentionner celle qui concerne, chez le rat, des neurones récepteurs projetant à la marge postérieure du bulbe olfactif, et probablement impliqués dans des chimio-détections spécialisées (Ring et al., 1997). Que se soit le groupe de neurones récepteurs positifs pour l'anticorps 2C6 ou celui des neurones récepteurs positifs pour l'anticorps Mab213, ils sont caractérisés par leur disposition symétrique dans les deux cavités nasales, et leurs projections également symétriques dans des territoires glomérulaires, constantes chez tous les animaux testés. En même temps qu'on observe cette spécificité immunologique intrinsèque, on découvre d'autres variations caractéristiques, comme par exemple un faible niveau d'expression de l'OMP des neurones récepteurs positifs pour 2C6 et pour Mab231, mais aussi une forte expression d'une acétyl choline-estérase des glomérules rejoints par les neurones distingués par Mab213, une faible pour les glomérules atteints par les fibres 2C6 positives. (Voir aussi Juilf et al., 1997, et Shinoda et al., 1993).

2.6.2.2. Autres marqueurs de surface: les lectines

C'est grâce à des lectines, interagissant avec des glycanes, que d'autres auteurs (Hempstead et Morgan, 1983; Key et Giorgi, 1986; 1990; Barber, 1989) montrent l'existence de plusieurs classes de neurorécepteurs. Ici encore, on peut parfois relier cette sélectivité aux états de maturation (Barber, 1989) et on trouve aussi des indices selon lesquels les projections des catégories révélées seraient, chez le rat et chez la grenouille, topographiquement organisées.

2.6.2.3. Marqueurs fluorescents

Des molécules fluorescentes ont aussi été utilisées pour marquer les neurorécepteurs olfactifs (Holl, 1981; Suzuki, 1984). A la suite de deux applications intra-nasales journalières de solutions de Jaune Procion, répétées pendant plusieurs jours consécutifs, chez des grenouilles se comportant librement, Suzuki observa un marquage d'environ 80% des neurorécepteurs. Il interpréta cette sélectivité comme étant liée à l'état de maturité des neurorécepteurs. Seuls ceux connectés au bulbe olfactif lui apparurent marqués, et donc des cellules très certainement capables de transmettre une information et activables par la stimulation olfactive. Pour ma part, j'ai pu observer, après que des prélèvements d'épithélium aient été incubés dans une solution saline (Ringer) en présence de Jaune Procion (Mx4R, 1%), sous un air non contrôlé, pendant cinq à quinze minutes, qu'une fraction des neurorécepteurs olfactifs captent le colorant fluorescent. Dans ces conditions, la sélectivité du marquage m'a semblé beaucoup plus importante que celle rapportée par Suzuki (Fig. 9).

Les raisons de la capture de tels colorants sont inconnues. Il a été cependant admis que l'abondance du marquage serait sous la dépendance d'une activité métabolique accrue (De Monasterio et al., 1981; Wilcox et Franceschini, 1984; Weidner et al, 1983; Schmued et Fallon, 1985; Sarthy et Hilbush; 1983). Certains de ces auteurs ont étudié, chez une mouche, la capture de colorant fluorescent par les cellules sensibles de la rétine. Seuls les photorécepteurs sensibles à une longueur d'onde particulière sont sélectivement marqués lorsque l'œil de la mouche a été irradié par la longueur d'onde en question. Au contraire, en l'absence d'éclairement, ces mêmes cellules ne fixent pas le colorant. Ces observations

laissent donc l'espoir d'obtenir des marquages des neurorécepteurs selon leurs propriétés fonctionnelles. D'autres types moléculaires, pourraient probablement servir de marqueurs puisque, par exemple, diverses protéines, incluant la peroxydase de raifort, peuvent être captées par la portion apicale des neurorécepteurs olfactifs (Kristensson et Olsson, 1971; Meredith et O'Connel, 1988).

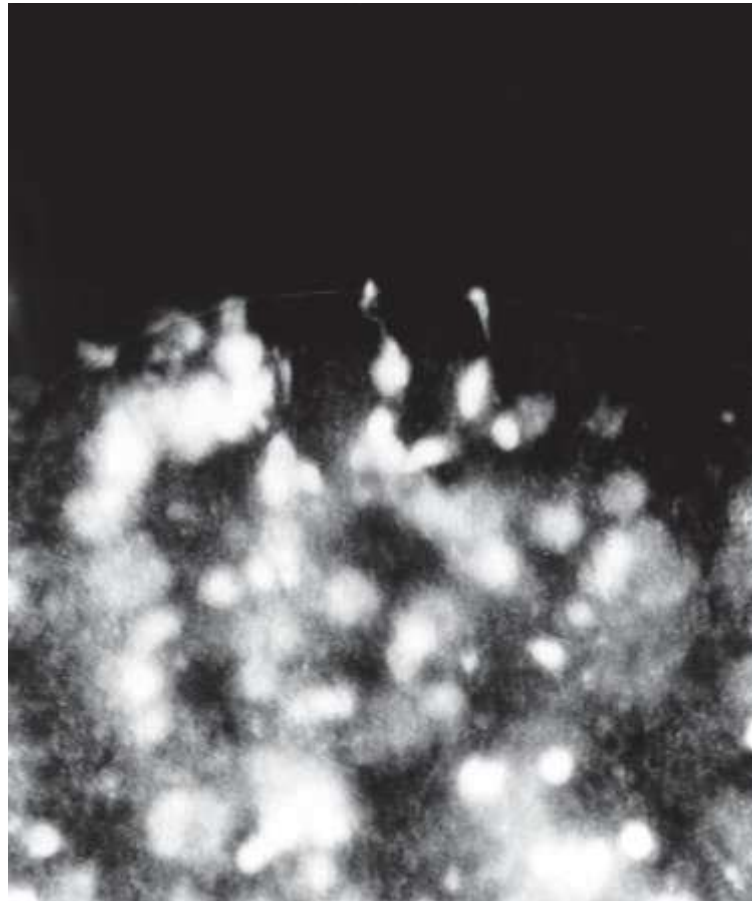


Figure 9: Marquage fluorescent d'une portion d'épithélium olfactif après incubation dans une solution de Ringer, en présence de Jaune Procion (1%), d'un prélèvement tissulaire chez la grenouille. Remarquez le faible pourcentage de neurorécepteurs marqués. Sicard, donnée originale.

2.6.2.4. Des neurones olfactifs sensibles au CO₂?

L'anhydrase carbonique correspond une famille d'enzymes qui catalyse l'hydratation du dioxyde de carbone. Il a été montré que certains neurones de l'épithélium olfactifs présentent une forte activité catalytique de ce type (Brown et al., 1984, Okamura et al., 1996). De plus, on a montré que la réponse électrophysiologique lente de la muqueuse au gaz carbonique était déprimée par l'application locale d'un inhibiteur de l'enzyme, alors que la réponse EOG aux mêmes sites à un odorant, l'acétate d'isoamyle, ne l'était pas (Coates et al., 1990). En fait des cellules présentant la même activité enzymatique sont aussi rencontrées dans l'épithélium respiratoire, si bien qu'on ne sait pas si les neurones sensibles aux CO₂ de l'épithélium olfactif doivent être considérés comme une spécialisation de neurones olfactifs ou bien comme un autre type cellulaire.

3. Aspects moléculaires de la transduction olfactive

Depuis l'intervention d'une biochimie moléculaire dans l'étude l'olfaction, un bon nombre de constats physiologiques ont trouvé une explication à l'échelle moléculaire. Nous proposons ici un bilan de ces données nouvelles, vision instantanée du mécanisme de transduction sensoriel olfactif dont nous devons être conscients qu'elle évoluera encore et, surtout, assez vite...

3.1. Les récepteurs aux odeurs

3.1.1. Une grande variété de protéines transmembranaires.

Chronologiquement, le fonctionnement et certains éléments impliqués dans la transduction olfactive ont été repérés et identifiés bien avant les récepteurs des odeurs eux-mêmes. Tenant compte de ces données accumulées sur la transduction olfactive, Buck et Axel font le pari que les récepteurs interagissent avec des protéines G, tout comme d'autres récepteurs transmembranaires bien connus, et annoncent en 1991 qu'ils ont découvert les premiers récepteurs olfactifs chez le rat. Plus exactement, ces chercheurs ont isolé les premiers ARN messagers codant pour une famille de protéines à sept domaines transmembranaires, ayant toutes les caractéristiques requises pour jouer le rôle de récepteurs des odeurs. Le fait qu'ils les trouvaient spécifiquement associés au tissu neuroépithélial olfactif était un argument déterminant.

Mille serait une approximation correcte du nombre de récepteurs possibles différents chez le rat. Cette estimation repose sur le constat que lorsqu'on marque les neurones qui contiennent un ARNm donné, au moyen d'hybridations *in situ*, environ une cellule sur mille est marquée. Cette grande diversité de séquences génomiques codant pour des protéines jouant un même rôle est exceptionnelle. L'existence de zones hypervariables dans les domaines transmembranaires 4 et 5, illustre l'idée de la multiplicité des spécificités de ces récepteurs (Lancet et Ben-Arie, 1993). La covariation de domaines transmembranaires et de la boucle extracellulaire 2, laisse supposer qu'un signal identifiant le récepteur est disponible à la surface de la cellule (Singer et al., 1995ab).

Par la suite, plusieurs groupes ont recherché ce type de récepteurs chez plusieurs espèces (Levy et al., 1991, Ngai et al., 1993a, Raming et al., 1993, Ressler et al., 1993, Freitag et al., 1995, Leibovici et al., 1996), y compris l'Homme (Selbie et al., 1992), et, ils ont ainsi augmenté le nombre des séquences protéiques connues appartenant à cette même famille. Cette multiplication corrobore l'idée d'une grande variété des récepteurs mais, surtout, elle a fini par montrer que l'on devait subdiviser cette famille (Fig. 10). En particulier, une sous-famille assez clairement distincte qui isole les récepteurs typiques des vertébrés aquatiques (Freitag et al., 1995), et qui semble également être bien moins nombreuse (Ngai et al., 1993) que ceux des vertébrés aériens étudiés à été identifiée. Remarquons au passage que ces variations soulignent l'**adaptation** écologique, de ces équipements en récepteurs: Le monde des molécules odorantes en milieu aqueux, molécules solubles, diffère de celui qui caractérise l'environnement aérien où les molécules organiques lipophiles foisonnent.

Plus récemment encore, une sous-famille de gènes orthologues codant pour des récepteurs olfactifs présentant à la fois des caractéristiques structurales particulières (dont une élongation de la 3^{ème} boucle extracellulaire et une abondance de résidus aminés chargés dans des positions conservées), une relative proximité des gènes qui les codent, et simul-

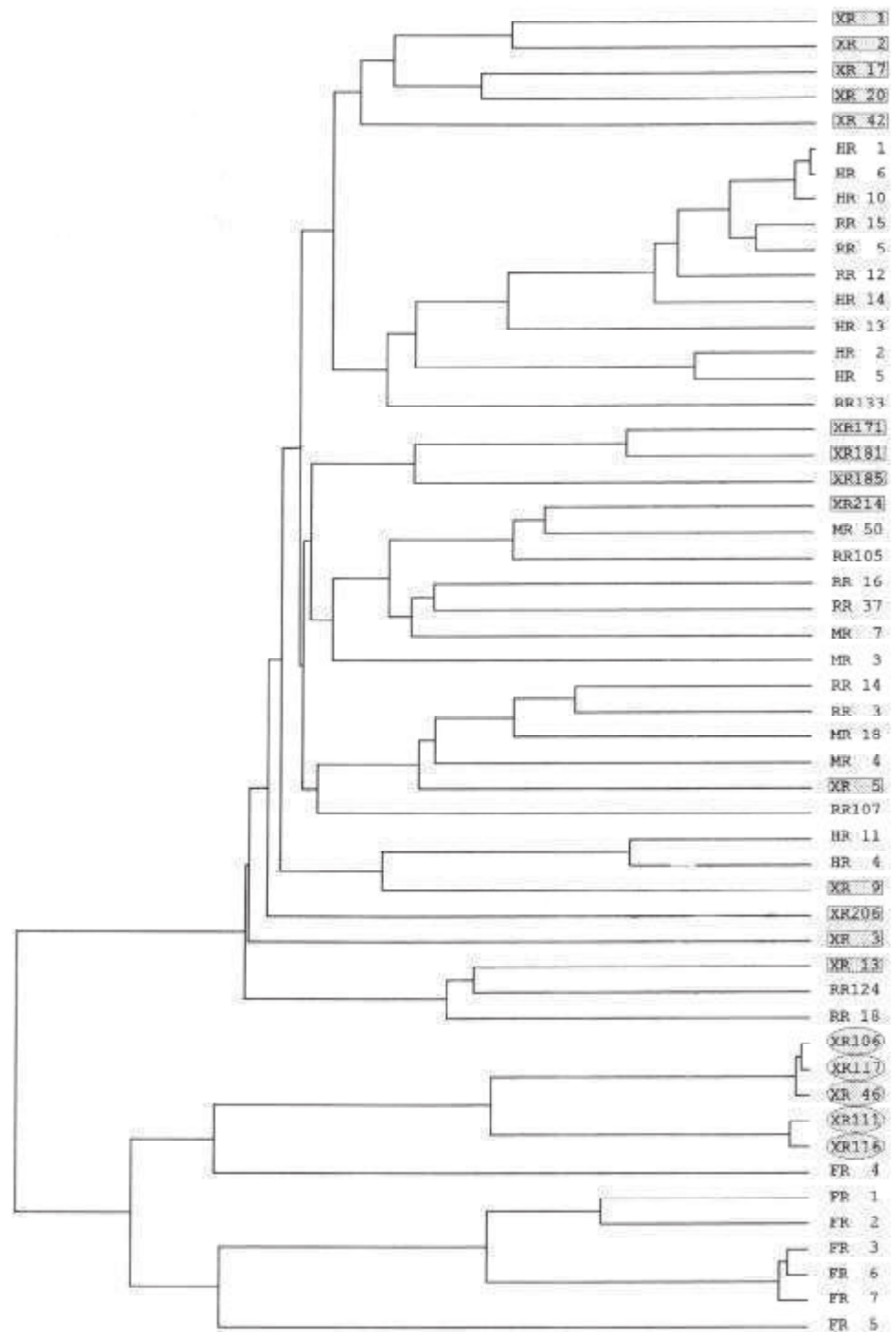


Figure 10: L'arbre phylogénétique de la super-famille des récepteurs olfactifs. Les récepteurs des poissons appartiennent à une famille (pourcentage d'homologie supérieur à 40%) divisible en deux sous-familles (pourcentage d'homologie supérieur à 60%). Beaucoup de ces récepteurs présentent plus de 90% d'homologie. Ces proximités de structure contraste avec les écarts qu'on observe chez le rat ou l'ensemble des séquences connues de mammifère ou de l'appareil olfactif aérien du Xénope, qui permettent de reconnaître 7 familles et 13 sous-familles. RR, rat, MR, souris, XR, xénope, FR, poisson, HR, homme. (d'après Freitag et al., 1995).

tanément, une distribution topographique plus restreinte que celles décrites pour les autres sous-familles a été rapportée (Kubick et al., 1997). Dans ce cas, la taille des zones de distribution et la variation concentrique de densité d'expression du récepteur sont tout à fait compatibles avec les foyers de forte sensibilité spécifique révélés par les approches électro- ou opto-électro-physiologiques (Scott et al., 1996, Kent et al., 1996). Les aspects purement génétiques sont encore en cours d'examen. En particulier, le contrôle de leur expression n'est pas encore bien appréhendé. Dans le génome humain, on découvre beaucoup de pseudo-gènes de récepteurs olfactifs, c'est-à-dire des gènes qui ne peuvent pas, ou plus (et traduisant alors une régression du sens olfactif), être exprimés (Rouquier et al., 1998, Trask et al., 1998).

Il faut aussi souligner qu'en fait on trouve des récepteurs appartenant à cette super-famille aussi dans d'autres systèmes: Il n'est pas très surprenant de les rencontrer dans le système gustatif (Abe et al., 1993) mais on les trouve passagèrement exprimés au cours du développement embryonnaire dans le tissu cardiaque (Drutel et al., 1995) ou dans une lignée de cellules pancréatiques (Blache et al., 1998). Plus excitante, la découverte de plusieurs variétés de ces récepteurs dans la lignée spermatique, y compris dans les spermatozoïdes matures (Vanderhaeghen et al., 1993, 1997) débouche sur une hypothèse révolutionnaire, qui permet d'envisager une rencontre entre le spermatozoïde et l'ovocyte qui ne tiendrait pas au seul hasard. En tout cas, ces récepteurs pourraient supporter une chimiotaxie des spermatozoïdes dans les voies génitales femelles. (Parmentier et al., 1992, Walensky et al., 1995, Vanderhaeghen et al., 1997).

Constatons enfin, que l'exploitation véritable de la dimension phylogénétique, voire l'utilisation des gènes codant pour les récepteurs olfactifs comme traceurs phylogénétiques dans le génome, reste à faire (mais voir toutefois Zhou et al., 1997).

3.1.2. La question de la spécificité

Ces récepteurs à sept domaines transmembranaires n'ont pas d'activité enzymatique connue, ils peuvent être considérés comme "catalyseur" des protéines G lorsqu'ils sont activés par leurs ligands. Restée assez longtemps hypothétique, l'implication des protéines découvertes par Buck et Axel dans la réception olfactive est consensuellement acceptée. Cependant, plusieurs tentatives d'expression de ces récepteurs dans des cellules d'accueil ont été menées. Moyennant la mise en oeuvre d'un vecteur infectant, ces cellules hôtes peuvent intégrer à leur génome un équipement génétique extrinsèque comprenant le gène codant pour un récepteur étranger.

Seuls, Raming et al., (1993), ont publié la pleine réussite de l'expression d'un gène codant pour un récepteur, OR5, dans une cellule d'eukaryote, Sf9. Selon eux, les cellules témoins ne manifestaient aucune réaction à la présence d'odorants dans le milieu de culture, mais les cellules transfectées réagissaient par une augmentation du taux d'IP3 intracellulaire. Ces cellules réagissaient sélectivement, répondant à 5 mélanges d'odorants sur les 13 testés. Malheureusement, il semble bien que cette même équipe éprouve quelques difficultés à reproduire un tel résultat. Une autre équipe confirma que la méthode se révèle impraticable pour tester de nombreux récepteurs (Gat et al., 1994, Nekrasova et al., 1996).

Le même groupe, associé à Prestwich (Kiefer et al., 1996), a tenté une expression du même récepteur, OR5, dans un autre modèle cellulaire, *Escherichia coli*, qui avait si bien réussi à d'autres étudiant des récepteurs appartenant à d'autres sous-familles (Marullo et al., 1992, Grisshammer et al., 1995). Seule une protéine réceptrice dont la première boucle extracellulaire a été transformée pour faciliter l'intégration de la protéine à la membrane, a pu

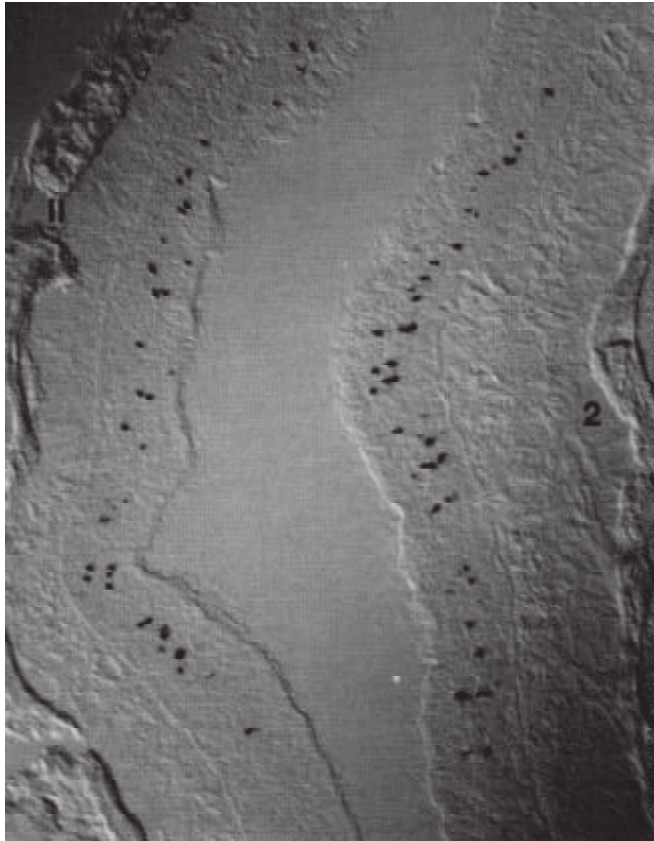
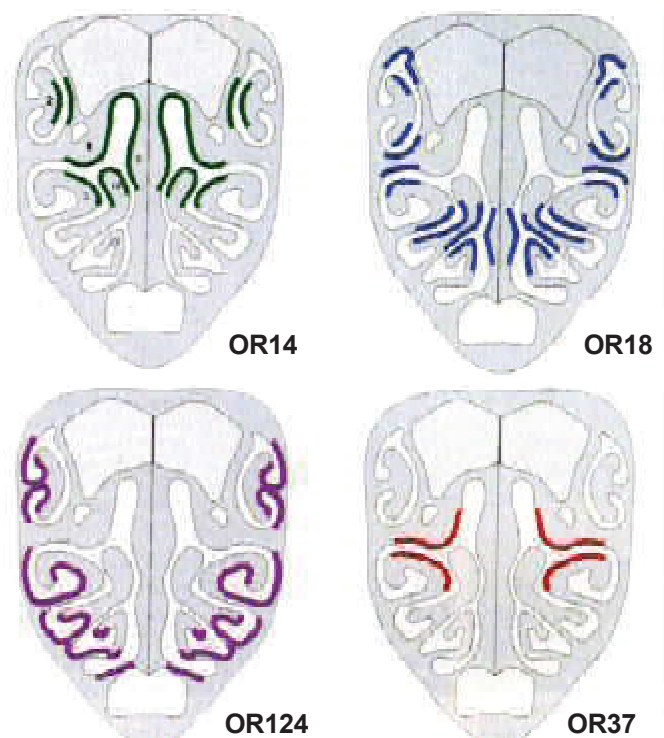


Figure 11: Coupe histologique de cornets olfactifs , ectoturbine 2 et endoturbine II et récepteurs aux odeurs. Les neurones sont marqués par hybridation *in situ* à l'aide d'un ARNm antisens construit sur un motif appartenant au récepteur OR14. On peut constater que les deux territoires olfactifs se faisant face et appartenant à deux cornets distincts sont marqués, ce qui laisse supposer un contrôle de la distribution des récepteurs. Par contre, à l'intérieur de chaque zone, la distribution paraît aléatoire. D'après Strotmann et al., 1994.

Figure 12: Quelques exemples de distributions régionales de récepteurs aux odeurs sur des coupes de cavités nasales de rat. Un récepteur donné se répartit dans des territoires plus ou moins étendus de la muqueuse olfactive. Cette distribution est symétrique, ce qui laisse également supposer un programme régulier présidant à sa mise en place. Ici, on voit la distribution de quatre récepteurs distincts, OR14, OR18, OR124 et celle réduite de OR37. D'après Strotmann et al., 1994.



être exprimée. Le marquage de la protéine produite, à l'aide d'un analogue photoactivable, a permis de confirmer la liaison du lilial avec la protéine réceptrice. On a déduit également que la constante de dissociation de la liaison est de $340\mu\text{M}$, ce qui apparaît faible relativement aux valeurs rencontrées pour d'autres systèmes ligands -récepteurs. Le lyral, molécule partageant les propriétés stimulantes du lilial, donne une valeur voisine ($KD=42\mu\text{M}$), alors que le citralva ou l'éthylvaniline, n'activant pas OR5 dans le modèle cellulaire sf9 ne se lie pratiquement pas aux récepteur ($KD>10^5\mu\text{M}$).

Mais, quoiqu'il en soit, la meilleure preuve de l'implication de tels récepteurs dans la réaction olfactive, vient d'être apportée (Zhao et al., 1998). Cette fois-ci, il a suffi de créer un vecteur viral comportant un gène de récepteur et un marqueur protéique sous contrôle du promoteur, et d'instiller une suspension de ce virus dans la cavité nasale de la souris pour que 10% environ des neurones olfactifs de l'animal expriment ce récepteur. Deux expériences supplémentaires démontrent que ce récepteur remplit bien sa fonction de récepteur d'odeur: La présence d'un récepteur sur-exprimé dans la population des neurones récepteurs olfactifs entraîne l'augmentation de la réponse globale, EOG, de la muqueuse olfactive à certaines catégories d'odorants. Fait remarquable, il a fallu en tester environ quatre-vingt pour trouver celui qui était efficace. Par ailleurs, les cellules étant marquées par la protéine fluorescente (*Green fluorescent protein*, GFP), après leur mises en suspension, peuvent être individuellement testées grâce à un enregistrement cellule entière au moyen d'électrodes de patch clamp. Toutes les cellules marquées et porteuses du récepteur répondaient au même odorant qui évoquait une réponse EOG amplifiée chez les animaux infectés. Ainsi, de cette étude, on retire l'impression qu'un récepteur donné peut-être très sélectif.

Une autre source d'information a été apportée par l'étude, élégante, de la chimiosensibilité du nématode, *Caenorhabditis elegans*. On tire avantage de l'étude de cet animal grâce, d'une part, au petit nombre de neurones que compte leur système nerveux (302 chez l'hermaphrodite!) qui sont repérés, anatomiquement et selon leur fonction, avec commodité, et, d'autre part, à la facilité d'observation de leurs comportements chimiquement orientés. Chez cet invertébré, on a découvert plusieurs gènes (entre 200 et 400) codant hypothétiquement pour des récepteurs à sept domaines transmembranaires et présentant des similitudes avec les séquences codant pour les récepteurs des odeurs des vertébrés (Troemel et al., 1995). Certains neurones sont clairement chimiosensoriels (Bargmann et al., 1993). Leur sélectivité a été identifiée après la destruction, un à un, des neurones en question et les variations d'orientation comportementale vis à vis de stimuli gazeux qu'elle entraînait. Ainsi on a constaté que les neurones AWA sont sensibles au diacétyl, à la pyrazine, aux thiazoles tandis que les neurones AWC détectent le benzaldéhyde, la butanone, l'alcool d'iso-amyle et des thiazoles (Bargmann et al., 1993). Les résultats de tests d'adaptation comparatifs chez des mutants, sont compatibles avec l'hypothèse de la multiplicité des mécanismes de transduction (y compris des récepteurs) sur un même neurone (Colbert et Bargmann, 1995): Même en présence d'une concentration auto-adaptante d'un odorant (benzaldéhyde), un même neurone continue à répondre à d'autres substances (alcool d'iso-amyl ou diacétyl). De plus, des mutations génétiques affectant une sensibilité d'un type de neurone chimiorécepteur, n'affecte pas la réponse à d'autres stimuli. Par exemple, la sensibilité au diacétyl des neurones AWA, apportée par le gène ODR-10, disparaît après mutation de ce gène alors que la sensibilité des mêmes neurones à la pyrazine persiste (Sengupta et al., 1996). De ces études, on retient ainsi qu'un même neurone chimiosensible de cet invertébré porte plusieurs récepteurs de spécificités différentes, ces récepteurs appartenant à la super-famille des récepteurs aux odeurs trouvés d'abord chez les vertébrés. Les auteurs avancent également l'hypothèse que ces associations de récepteurs différents sur un même neurone sensoriel pourraient permettre l'identification d'une source odorante complexe par le neurone lui-même (Troemel et al., 1995).

3.1.3. Aspects distributionnels

C'est à deux niveaux d'organisation que nous nous intéressons ci-dessous. D'une part, en regard d'une chimiotopie périphérique déjà caractérisée plus haut, on trouve une distribution organisée des récepteurs dans l'épithélium olfactif. D'autre part, les neurones porteurs d'un même récepteur convergent vers les mêmes glomérules bulbaires.

3.1.3.1. Ségrégation périphérique

La distribution des récepteurs dans la population des neurorécepteurs n'est pas aléatoire. Nous avons vu que l'hétérogénéité spatiale de la sensibilité de la muqueuse olfactive a été découverte assez tôt (Costanzo et Mozell, 1976, Mustaparta, 1971, Mackay-Sim et al., 1982, Edwards et al., 1988). Une chimiotopie n'existe pas chez toutes les espèces mais lorsqu'on la trouve, elle semble bien reproductible d'un animal à l'autre (Mackay-Sim et al., 1982).

Après avoir découvert les récepteurs aux odeurs chez le rat, on a vite observé que leur distribution dans les territoires olfactifs était organisée (Fig. 11 et 12). Selon ces observations, l'épithélium est divisé en 4 zones, un récepteur ne pouvant être localisé que dans l'une d'entre elles (Nef et al., 1992, Strottmann et al., 1992, Ressler et al., 1993). Le plus souvent, la distribution à l'intérieur de ces aires ne paraît pas fixée, les neurones récepteurs portant des récepteurs identiques n'ayant pas tendance à se regrouper. Au contraire, certaines distributions focales de certains récepteurs (Kubick et al., 1997, Strottmann et al., 1996) suggèrent un contrôle de la transcription de ces récepteurs.

On notera qu'une telle ségrégation n'a pas été trouvée jusqu'ici chez d'autres espèces, ni chez le poisson chat (Ngai et al., 1993b) ni chez le poulet (Leibovici et al., 1996).

3.1.3.2. Convergences bulbaires

Parmi les découvertes entraînées par l'identification des gènes des récepteurs olfactifs, le fait qu'on trouve les ARNm jusque dans les terminaisons synaptiques des neurones récepteurs olfactifs (Fig. 13) apporte un éclairage essentiel sur l'organisation fonctionnelle. En effet, il démontre, chez quelques espèces de rongeurs, l'existence d'une convergence très forte, voire sur un seul glomérule, des axones des neurones porteurs d'un même récepteur aux odeurs (Ressler et al., 1994, Vassar et al., 1994). Cette simplification rationnelle de la description des relations fonctionnelles épithélio-bulbaires remplace avantageusement l'idée d'un regroupement des fibres de même sensibilité (Shepherd, 1985). Bien sûr, cette nouvelle ne résout pas les questions liées au concept de codage spatial de l'odeur, mais elle fixe un cadre pour inscrire des données d'ordre fonctionnelles.

L'une des expériences captivantes, a consisté à marquer les projections bulbaires des neurones porteurs d'un récepteur, P_2 , au moyen d'un gène reporter (lac-Z) chez des souris transgéniques et à comparer la projection des cellules exprimant le récepteur P_2 chez les animaux témoins et des animaux dont le nerf olfactif a été sectionné. Chez les sujets témoins, on observe une convergence presque parfaite sur un seul glomérule. Au bout de 2 à 4 mois de récupération chez les sujets lésés, on observe que les fibres qui ont repoussé et qui sont marquées se sont dirigées dans un même secteur bulbaire mais qu'elles atteignent beaucoup

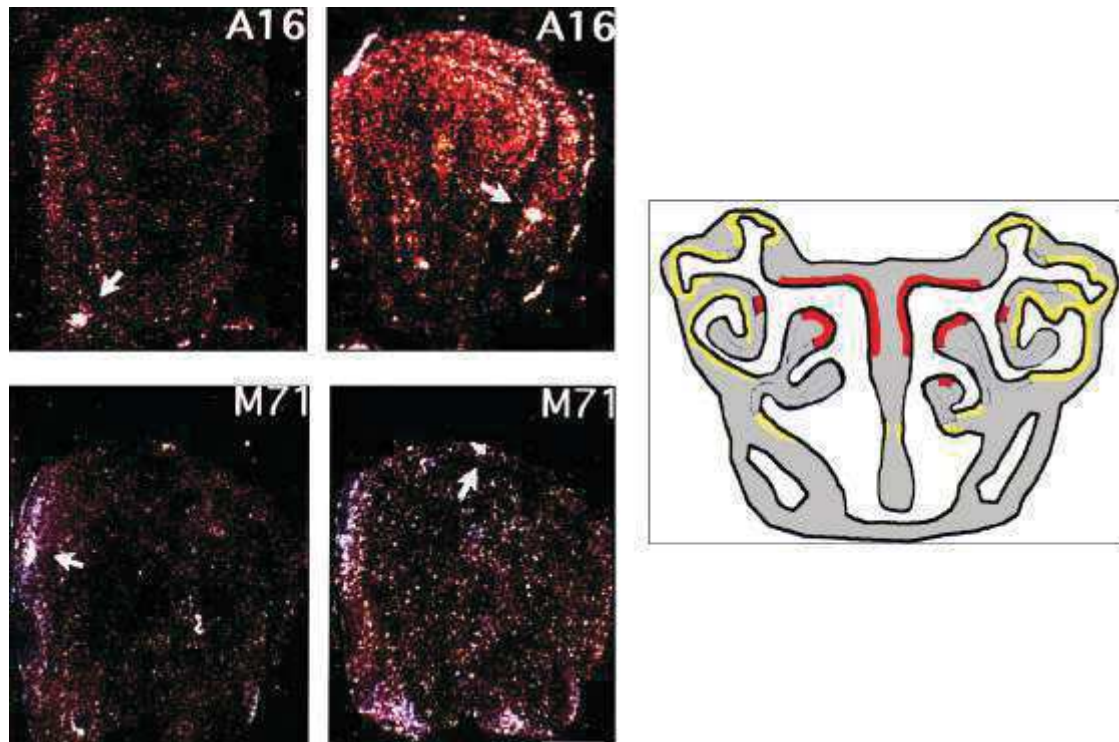


Figure 13: Distribution épithéliale des récepteurs aux odeurs et de leurs projections bulbaires. Sur la coupe de la cavité nasale, à droite, apparaissent, en rouge la zone de distribution du récepteur M71, en jaune celle du récepteur A16. Les neurones récepteurs qui expriment un récepteur donné projettent sur un ou deux glomérules du bulbe olfactif, comme illustré à gauche (D'après Ressler et al., 1994).

plus de glomérules, par une convergence moins stricte (Costanzo, 1997).

3.1.4 Régulation de l'expression des gènes récepteurs

Un autre chapitre reste aujourd'hui à écrire concernant la régulation de l'expression des gènes des récepteurs olfactifs. En particulier, compte tenu du fait de la convergence des axones des neurones récepteurs olfactifs, on peut se demander quelles influences les cibles bulbaires exercent sur les cellules périphériques. Toutefois, il paraît assez clair que l'expression des récepteurs aux odeurs entre le 12^{ième} et le 14^{ième} jour dans les neurones récepteurs olfactifs précède la mise en place de leurs synapses sur leur cibles bulbaires, intervenant au 18^{ième} jour de développement embryonnaire chez le rat (Strotmann et al., 1995). Rappelons que des réponses électrophysiologiques aux stimulations olfactives ont d'ailleurs été enregistrées avant que ces connexions s'établissent (Gesteland et al., 1982). De même, leur mode de distribution zonale, reproductible d'un individu à l'autre, apparaît avant que ne s'établissent les contacts synaptiques glomérulaires et indépendant de l'existence même des bulbes olfactifs puisqu'il est aussi repérable chez des souris mutantes sans bulbe olfactif (Sullivan et al., 1995).

Un autre aspect de la gestion des récepteurs, concerne leur adressage et leur concentration dans les territoires ciliaires et là aussi, on commence à entrevoir les premiers systèmes de régulation sous la forme de protéines spécifiques associées aux membranes intracellulaires des neurones olfactifs (Dwyer et al., 1998). Mais là les données sont encore trop éparpillées pour qu'un réel bilan puisse être proposé. Ce que l'on peut prévoir c'est, qu'au moins pour les espèces où une distribution spatiale organisée est prouvée, et compte tenu de sa permanence chez les individus d'une même espèce, c'est que de telles règles existent!

Celles qui nous intéressent le plus ici, c'est à dire celles qui régissent l'expression des récepteurs par neurorécepteurs et établissent leur polymorphisme sont actuellement la cible de plusieurs équipes. La création de lignée de souris transgéniques, d'une manière plus générale, la possibilité de transfection de gènes, c'est à dire la possibilité de suivre l'expression d'un récepteur donné apporte un soutien prometteur pour suivre cette route (Wang et al., 1998).

3.2 Les cascades enzymatiques et ioniques de la transduction sensorielle

3.2.1. Protéines G

On a identifié de multiples types de protéines G, toutes n'ayant pas les mêmes structures mais fixant toutes le GTP. La famille de celles qui nous intéressent ici est constituée d'hétérotrimères composés de 3 sous-unités:

- α , dont il existe des formes variées, élément spécifique de la protéine G; ces sous-unités hydrophiles sont ancrées dans la membrane plasmique.
- β , peu nombreuses sont virtuellement identiques; elles aussi sont hydrophiles et ancrées.
- et γ , hydrophobes, toutes assez semblables.

Elles sont présentes à la face intracellulaire de la membrane plasmique et la formation du trimère par association de la sous-unité $G\alpha$ et du dimère $G\beta\gamma$ dépend de l'état des récepteurs (R). En l'absence de récepteur activé, le trimère est stable, mais est scindé lorsque le récepteur est activé par son interaction avec le signal extracellulaire: La ou les cascades de transduction (Fig. 14), sont sous contrôle des $G\alpha$ et/ou des $G\beta\gamma$. Les effecteurs de $G\alpha$ et de $G\beta\gamma$ peuvent être identiques ou différents (Bockaert et Pin, 1998). Parmi ceux-ci on trouve des adénylyl cyclases ou des phospholipases, responsables de la synthèse des seconds messagers, signaux intracellulaires commandant l'état d'ouverture de canaux ioniques membranaires par exemple.

Fonctionnellement, les protéines G de ce type sont donc des éléments de cascades enzymatiques impliquées dans la transduction de signaux extracellulaires. En fait, il en existe toute une variété, celle-ci conduisant à des comportements différents, voire opposés, des voies de transduction dans lesquelles elles sont intercalées. On distingue, sur la base de leurs effets, plusieurs sous-familles des protéines G_s (activatrices), et G_i (inhibitrices), et de nombreux sous-types selon leurs structures primaires (Fig. 15). G_o est principalement localisée dans le tissu nerveux central, et les tissus neuroendocriniens. G_{i1} est localisée dans le tissu nerveux central, mais aussi dans la rate et les poumons tandis que G_{i2} et les ARNm de $G_{i2}\alpha$ sont présents dans tous les tissus testés. Les ARNm de $G_{i3}\alpha$ sont plutôt exprimés dans les tissus périphériques mais les protéines $G_{i3}\alpha$ sont rares dans le cerveau, sauf dans des neurones contenant de la cholecystokinine. Les sous-unités $G_o\alpha$ et $G_{i1}\alpha$ se distribuent de façon voisine dans le tissu nerveux central. La distribution de $G_{i2}\alpha$ n'est pas connue.

On a rapporté la présence de $G_s\alpha$, $G_i\alpha$ et $G_o\alpha$ aussi bien dans l'épithélium olfactif de grenouille que de rat (Pace et al., 1985, Anholt, et al., 1987, Mania-Farnell et Farbman, 1990). Selon Shinohara et al. (1992), qui ont étudié la distribution des cinq sous-unités $G\alpha$ trouvées antérieurement dans le système olfactif périphérique (Jones et al., 1988), $G_{i1}\alpha$ et $G_{i3}\alpha$ ne sont pas présentes dans ces structures. $G_{i2}\alpha$ est présente dans la portion apicale de quelques neurones récepteurs isolés. On trouve également dans la ciliature olfactive le complexe $\beta\gamma$. La protéine $G_o\alpha$ n'est, elle, pas localisée dans les cils olfactifs, donc pas directement impliquée dans la transduction sensorielle. On a découvert une forme spécifique de G_s , G_{olf} affichant 88% d'homologie avec celle-ci, et associée aux cils olfactifs des neurones récepteurs olfactifs et

activatrice de l'adénylate cyclase (Jones et Reed, 1989). On a par la suite retrouvé cette protéine dans d'autres territoires nerveux (Hervé et al., 1995).

C'est donc la protéine $G_{olf}\alpha$ qu'on trouve dans les cils olfactifs (Menco et al., 1992, 1994). Effectivement, on a montré chez des souris génétiquement manipulées que l'absence de G_{olf} s'accompagne d'une anosmie (Belluscio et al., 1998).

Hypothétiquement, les cellules dont les cils sont immunoréactifs à l'anticorps dirigé contre $G_{i2}\alpha$, pourraient correspondre à des neurones récepteurs codant pour les odorants n'évoquant pas la voie de transduction AMPc. Selon cette conception, les protéines G contribueraient à la discrimination des odorants. Ajoutons enfin, que dans les terminaisons glomérulaires, on trouve à la fois la sous-unité $G_o\alpha$ et le complexe $G\beta\gamma$.

3.2.2. Voie de l'adénosine monophosphate cyclique, AMPc

L'importance de l'AMP cyclique dans la transduction sensorielle olfactive a été découverte par une approche électrophysiologique dès 1973 par les Russes (Minor et Sakina, 1973), et n'a été confirmée par des approches biochimiques qu'une dizaine d'années plus tard (Chen et Lancet, 1984; Pace et al., 1985; Anholt et al., 1986; Boekhoff et Breer, 1990). Des préparations de membranes de neurones récepteurs, ou mieux, de cils olfactifs isolés par un choc calcique, montraient l'élévation de l'activité de l'adénylate cyclase lorsqu'elles étaient incubées en présence de certains odorants. Dans ces préparations de cils olfactifs et avec une méthode d'observation biochimique, l'accroissement d'AMPc est transitoire et rapide, intervenant dans les 50 ms suivant l'ajout du stimulus. Cette durée est inférieure, donc compatible, avec la latence (comprise entre 50 et 500ms) de la réponse électrophysiologique enregistrée sur des neurones récepteurs isolées (Kurahashi et al., 1989; Firestein et al., 1991ab; Lowe et Gold, 1993a) et est liée à l'activité de la protéine kinase A (Boekhoff et al., 1992), de la kinase du récepteur β -adrénergique (Schleicher et al., 1993), ou de la phospho-diesterase (Yan, et al., 1995). L'augmentation d'AMPc est bloquée par la toxine cholérique, ce qui suggère la participation d'une protéine Gs activatrice d'une cyclase (Pace et al., 1986, Sklar et al., 1986). L'atténuation de cette réponse est très rapide. On peut l'expliquer par une phosphorylation inactivant le récepteur: Le blocage de la protéine kinase A par l'inhibiteur de Walsh prolonge la réponse à l'odorant (Boekhoff et al., 1990). On a finalement isolé une nouvelle adénylyl cyclase, type III, à partir des cils olfactifs de rat (Bakalyar et Reed, 1990).

Grâce à la méthode patch clamp sur cil olfactif, l'action directe de l'AMPc sur une conductance cationique ciliaire, peu spécifique, a été confirmée (Nakamura et Gold, 1987). La dépolarisation consécutive à la stimulation chimique est d'abord liée à la pénétration d'ions sodiques et calciques (Zufall et al., 1994). Cependant des canaux perméables aux ions Cl^- , s'ouvrent aussi sous la dépendance de l'influx de calcium (Kleene et al., 1991, 1993), expliquant 40% chez le poisson à 85% chez le rat du potentiel de récepteur (Kurahashi and Yau, 1993, Lowe et Gold, 1993).

Cependant, très vite, l'étude de cette voie a permis de se rendre compte que certains odorants n'activaient pas la production d'AMPc (Sklar et al., 1986). Une alternative devait donc être envisagée.

3.2.3. Le canal ionique contrôlé par le second messenger nucléotidique

Il existe une famille de canaux ioniques sensibles aux seconds messagers nucléotidiques, c'est à dire que leur ouverture est commandée par une liaison avec ces signaux intracellulaires. L'un d'entre eux, qu'on a d'abord cru spécifique du système olfactif (El-Husseini et al., 1995;

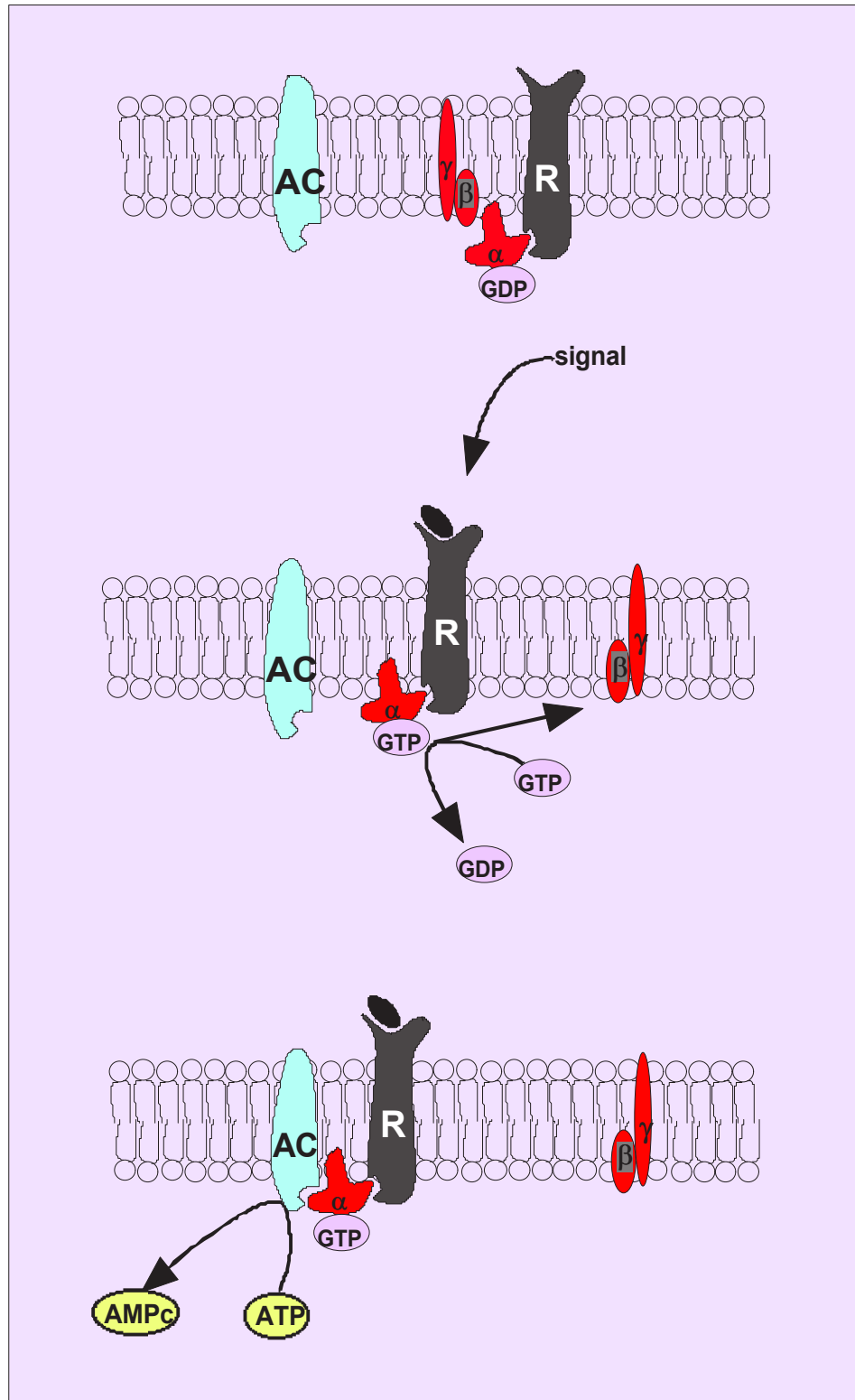


Figure 14: Schéma du mécanisme d'activation de la production d'un second messenger par l'intermédiaire d'une protéine G sous la dépendance d'un signal extracellulaire pour un récepteur transmembranaire. En l'absence de récepteur actif, le complexe $G\alpha\beta\gamma$ est inactif. La réception d'un signal extracellulaire par le récepteur active la cascade de transduction: La sous-unité $G\alpha$, porteuse d'un site guanyl-nucléotidique, est phosphorylée et porte dès lors un GTP; consécutivement, elle se dissocie du complexe $\beta\gamma$ et active à son tour l'enzyme adénylate cyclase AC qui catalyse la transformation d'ATP en AMPc, c'est à dire produit le second messenger. La protéine $G\alpha$ a une activité GTPasique. La consommation du GTP désactive la protéine $G\alpha$. Le système est amplifiant (c'est à dire qu'une molécule signal conduit à de multiple molécules de second messagers, signaux intracellulaires), entre autre, parce qu'un récepteur reste activé pendant une durée suffisante pour interagir avec plusieurs protéines G.

Bradley et al., 1997), a été trouvé en forte densité associé à la membrane des cils olfactifs (Kurahashi et Kaneko, 1991).

Le canal olfactif contrôlé par nucléotide cyclique, est de la même famille que celui trouvé dans les cellules photoréceptrices et contrôlé par GMPc (57% d'homologie) (Ludwig et al., 1990; Kaupp, 1991). Ces canaux sont trouvés à une densité de 205 à 2400 unités/ μm^2 dans la membrane des cils olfactifs, et seulement à raison de 0,2-25 unités/ μm^2 au niveau du corps cellulaire des neurones récepteurs olfactifs (Kurahashi et Kaneko, 1991, Suzuki, 1990, Zufall et al., 1991ab).

Ce canal représente la conductance, cationique peu spécifique, qui dépolarise la membrane ciliaire en réponse à la stimulation chimique via son activation par l'AMPc (Nakamura et Gold, 1987; Kurahashi, 1989; Firestein et al., 1991; Frings et al., 1992). Ce type de canal est constitué d'hétéro-oligomères dont six régions traversent la membrane plasmique (Dhallan et al., 1990; Chen et al., 1993; Bradley et al., 1994; Liman et Buck, 1994; Körschen et al., 1995; Liu et al., 1996). L'implication de ce canal dans la réaction olfactive est telle que l'élimination de son expression par le génie génétique entraîne une anosmie générale chez des souris au génome altéré (Brunet et al., 1996).

Les sous-unités de ces canaux ont été clonées chez plusieurs espèces et présentent une forte homologie et un même mode de fonctionnement. La portion C-terminale intracellulaire porte le site de fixation du nucléotide cyclique activateur. La portion N-terminale, également intracellulaire, porte un site de fixation de la calmoduline, modulateur de la conductance du canal (Chen et Yau, 1994; Liu et al., 1996) et probablement d'un autre facteur encore indéterminé (Zufall et al., 1996), peut-être des protéines régulatrices des protéines G récemment identifiées dans d'autres systèmes (Dohlman et Thorner, 1997). Ce site est voisin d'un résidu sérine, site de phosphorylation, qui pourrait commander *in situ* la sensibilité du canal vis à vis de l'influence du second messenger nucléotidique (Müller et al., 1998). Cette phosphorylation pourrait être catalysée par l'une des trois isoformes (δ, γ, λ) de phosphokinases C identifiées dans les cils olfactifs et les vésicules olfactives du rat. Ce canal olfactif contrôlé par nucléotide cyclique, est de la même famille que celui trouvé dans les cellules photoréceptrices, et contrôlé par GMPc (57% d'homologie). La régulation qu'exerce le calcium sur son activité ne s'applique pas directement au canal lui-même. Cette particularité n'empêche évidemment pas d'autres modulations calciques directes sur la voie de transduction, notamment celles qui s'exercent sur la phosphodiesterase (Dawson et al., 1993) ou celles responsables de l'adaptation à plus long terme impliquant les phosphorylations du récepteur (Boekhoff et Breer, 1992).

L'ouverture du canal est dépendante de l'action coopérative de 2 ou 3 molécules d'AMPc (Nakamura et Gold, 1987; Dhallan, et al., 1990). La durée de la réponse du canal olfactif dépasse largement la durée de l'application du second messenger AMPc et dépend du potentiel membranaire et de l'agoniste. Ainsi, de ces caractéristiques et de la rapidité de la libération d'AMPc (Lowe et al., 1993b), il découle que le décours de la dépolarisation réceptrice dépendrait plus des propriétés du canal que de la cinétique enzymatique de production de l'AMPc par la cascade de transduction.

3.2.3. La voie de l'inositol triphosphate

Des arguments assurant l'implication de voies alternatives ont déjà été produits. Un système reposant sur un autre second messenger, l'inositol triphosphate (IP3) a été mis en évidence, d'abord, en étudiant les neurones récepteur olfactifs de poisson (Huque et Bruch, 1986) et d'insectes (Boekhoff et al., 1990). Cette voie est la seule identifiée chez ces derniers.

L'hypothèse d'une autre voie, y compris chez le mammifère, a pris de la consistance lorsque l'on a démontré que les substances qui n'évoquaient pas de réponse de la voie AMPc activaient justement la production d'IP₃, sur des préparations de cils isolés de la muqueuse olfactive du rat (Boekhoff et al., 1990). Il est important de noter que la toxine de Pertussis bloque les réponses de la voie IP₃ chez le rat, donc très probablement une protéine G_o, alors que G_{olf} y est insensible.

Chez le poisson, l'augmentation d'IP₃ est stimulée par des stimulus composés d'acides aminés (Huque et Bruch, 1986). On a confirmé ensuite que l'IP₃ avait le pouvoir d'ouvrir des conductances cationiques peu spécifiques chez le poisson chat (Restrepo et al., 1990). On a ensuite montré l'ouverture de canaux non-spécifiques par l'application directe d'IP₃ chez la grenouille (Suzuki, 1994), chez le xénope (Schild, 1995), chez le rat (Restrepo et al., 1992, Okada et al., 1994; Honda et al., 1995; Lischka et al., 1995). Le même type d'observation a été réalisé chez certains invertébrés (Fadool et Ache, 1992; Stengl, 1994). L'activation de la phospholipase C qui catalyse la production IP₃ à partir des phospholipides membranaires est assurée par le GTP ou son analogue structural, le GTP γ S. L'implication de la phospholipase C dans la réponse olfactive chez le poisson reçoit également une confirmation puisque son inhibiteur, la néomycine (50 μ M), atténue l'électro-olfactogramme de la rosette olfactive stimulée par les acides aminés. Récemment, on a montré la participation d'un canal nucléotide-dépendant dans la réponse passant par la phospholipase C, attestée par l'effet inhibiteur du ruthenium red (Ma et Michel, 1998) suggérant que l'hypothèse d'une interaction entre les voies de transduction est bien fondée (Anholt et Rivers, 1990). La présence de sites récepteurs membranaires de l'IP₃ dans la membrane des cils olfactifs du rat a été démontrée (Cunnighamm et al., 1993). Malgré quelques tentatives infructueuses enregistrées lors des premières études électrophysiologiques chez les vertébrés supérieurs (Firestein et al., 1991, Lowe et Gold, 1993), on a fini par montrer que plusieurs conductances calciques sont activées par l'application intracellulaire d'IP₃ sur les neurones récepteurs du Xénope (Schild et al., 1995b). Le courant calcique précoce est porté par une conduction spécifique, tandis qu'un autre, plus tardif est porté par une conductance non spécifique. La variation calcique précoce observée grâce au Fura-2 est localisée à la vésicule et aux cils olfactifs.

L'inhibition de la protéine kinase C par la sphingosine, amortit la relaxation de cet effet, ce qui suggère que le récepteur à l'origine de la réaction pourrait être désactivé par une phosphorylation (Boekhoff et al., 1990).

Ces données restent cependant incomplètes: La cible ou les cibles de l'IP₃ engagées dans la transduction olfactive ne sont toujours pas clairement identifiées. Par ailleurs, l'hypothèse d'une interaction entre les deux voies de transduction chez les vertébrés reste ouverte (Rawson et Restrepo, 1994).

3.2.5. Autres systèmes transducteurs potentiels

Bien entendu, dans la membrane des cellules réceptrices olfactives, on s'attend à trouver d'autres mécanismes transductionnels membranaires qui ne sont d'ailleurs pas forcément engagés dans la transduction sensorielle. C'est par exemple le cas, du système de transduction du signal commandé par la dopamine mis en évidence par Coronas et al. (1997). La localisation en profondeur de la muqueuse olfactive des récepteurs de la dopamine fait que ce système nous concerne peu ici. Mais on a aussi détecté, par exemple, une guanylyl cyclase membranaire, spécifique de l'épithélium olfactif et réservée à une sous-population de neurone récepteurs olfactifs et dont la dispersion rappelle celle des récepteurs olfactifs découvert par Buck et Axel (Fülle et al., 1995). Leur ressemblance structurale avec le récepteur du peptide

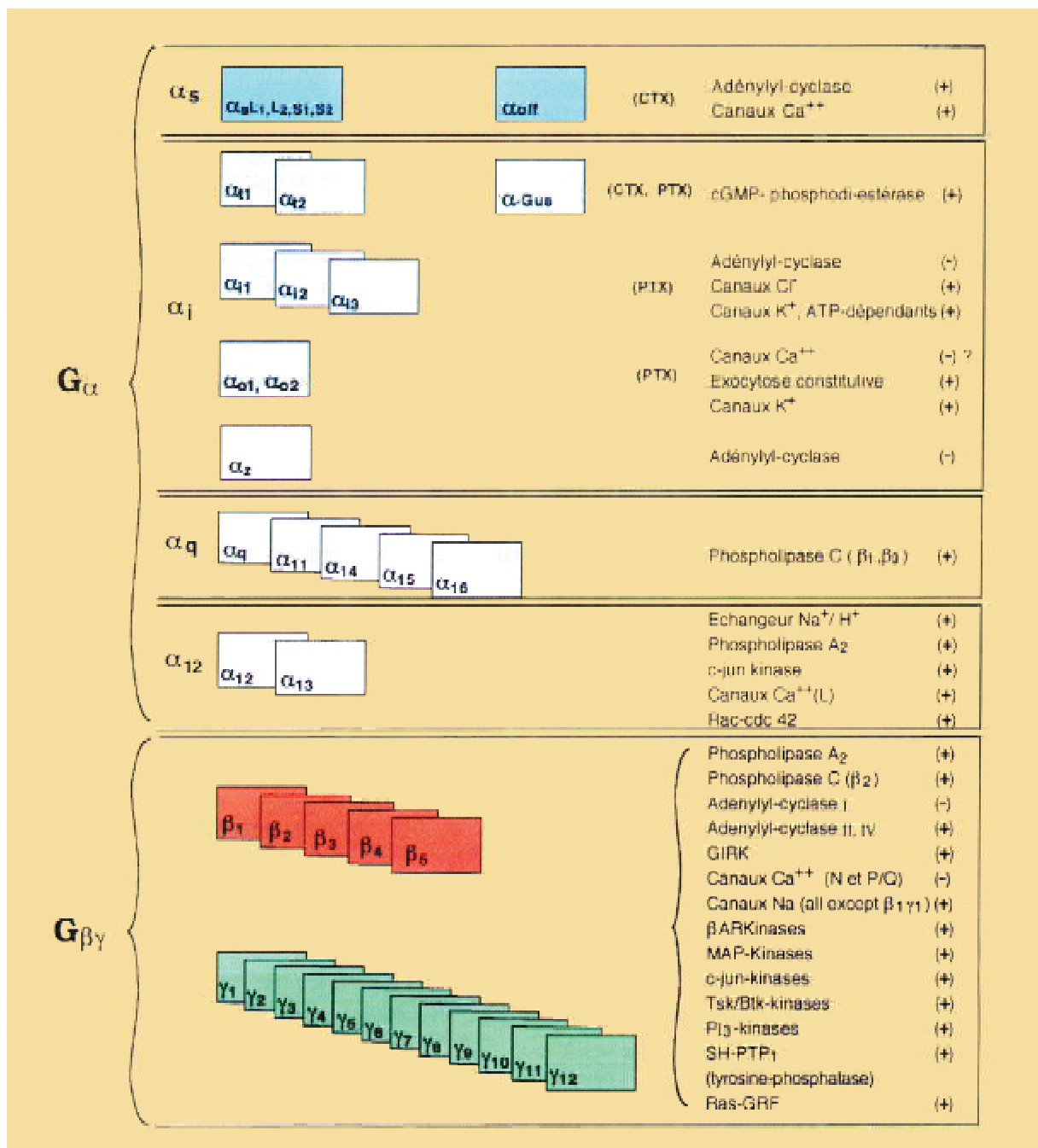


Figure 15: Les diverses protéines G, leurs fonctions et leurs effecteurs. Les G_{α} peuvent être réparties selon leurs séquences en 4 classes. Toutes n'ont pas la même réactivité vis à vis des toxines (Choléra=CTX, Bordetella pertussis, PTX). SH-ptP1: Une protéine tyrosine phosphatase préférentiellement exprimée dans les cellules hématopoïétiques. Ras-GRF: Une protéine d'échange GDP/GTP de la petite protéine G Ras. D'après Boeckart et Pin, 1998.

natriurétique suggère qu'ils pourraient représenter une alternative aux systèmes transducteurs sensoriels que l'on a envisagés jusqu'ici. Ces récepteurs pourraient être l'une des cibles du cGMP produit lors de la réponse olfactive et dont on a montré la capacité à réduire la réactivité des cils olfactifs aux stimulus chimiques (Dhallan et al., 1990; Breer et al., 1992; Verma et al., 1993; Ziegelberger et al., 1990, Kroner et al., 1996).

C'est, par ailleurs en examinant le rôle du cGMP que la participation dans les phénomènes de la transduction olfactive des seconds messagers gazeux, NO et CO, a été envisagée (Verma, et al., 1993; Ingi et Ronnett, 1995; Zufall et Leinder, 1997). La contribution réelle de NO dans les mécanismes de la transduction olfactive n'est pas encore déterminée, restant hypothétique surtout du fait de l'absence de la NO synthase neuronale dans l'épithélium olfactif (Dellacorte et al., 1995, Zhao et al., 1994). Par contre, on constate l'implication du CO dans le mécanisme d'adaptation à long terme médié aussi par le cGMP (Leinders-Zufall et al., 1996, Zufall et Leinders-Zufall, 1997). Ces deux messagers pourraient jouer un rôle lors de la mise en place du système.

Concernant les mécanismes de réception/transduction, nous mentionnerons encore une autre hypothèse, défendue surtout par le groupe de Kurihara (Kashiwayanagi et al., 1990, Kashiwayanagi et Kurihara, 1996), qui fait jouer aux interactions directes des molécules odorantes avec lipides membranaires un rôle dans la transduction sensorielle. La participation de telles interactions moins spécifiques que celles qui mettent en jeu une interaction avec une protéine réceptrice dédiée, est difficile à exclure. Des modifications membranaires suivant la stimulation olfactive sont attestées par des mesures fluorométrique de variations de fluidité membranaires. D'autres auteurs ont d'ailleurs montré des réponses aux stimulations chimiques sur des cellules qui ne sont apparemment pas impliquées dans la détection chimique (Lerner et al, 1988). On peut peut-être envisager que des mécanismes particuliers soient mis en oeuvre pour éviter le bruit sensoriel que de tels phénomènes pourraient provoquer.

3.2.6. Calcium et transduction sensorielle olfactive.

Jusqu'ici, nous avons vu que la stimulation olfactive, qu'elle recrute la voie AMPc ou la voie IP₃, a pour conséquence une élévation de concentration calcique dans le cytosol ciliaire. Ainsi, on doit admettre que le calcium constitue un 3^{ième} messenger! L'activation de la voie AMPc, comme de la voie IP₃, entraîne une augmentation de la concentration calcique intraciliaire (Restrepo et al., 1993, Tareilus et al., 1995), les ions calcium passant au travers de canaux cationiques peu spécifiques (Nakamura et Gold, 1987) ou étant mobilisés depuis les stocks intracellulaires et, ceci, même si, chez le homard au moins, on observe que les activations de ces voies ont des effets électriques opposés (Michel et Ache, 1994). L'augmentation de la concentration calcique intraciliaire n'est pas suffisante pour expliquer l'amplitude de la dépolarisation consécutive à la stimulation odorante, mais on a finalement découvert qu'elle exerce son influence sur des canaux chlore, dont la mobilisation peut rendre compte de l'importance de cette réponse transmembranaire (Kleene et Gesteland, 1991, Kleene, 1993, Kurahashi et Yau, 1993). La place du calcium comme élément régulateur de la transduction sensorielle olfactive est cependant beaucoup plus complexe puisqu'il intervient à la fois sur la dépolarisation et sur la repolarisation membranaire: Il existe des canaux potassiques sensibles au calcium intracellulaire responsables d'hyperpolarisations (Maue et Dionne, 1987, Lucero et Chen, 1997). Par ailleurs, les ions calcium exercent une rétroaction négative sur l'ouverture du canal ionique sous contrôle de l'AMPc, impliqués donc dans la gestion des processus d'adaptation (Kurahashi et Shibuya, 1990). De plus, ils participent aussi à la régulation de l'activité d'enzymes clés dans la transduction olfactive (Borisys et al., 1992).

Le calcium intervient donc dans des phénomènes d'adaptation périphérique. On observe que le potentiel de récepteur décroît exponentiellement après un créneau de stimulation (odorante) de 50 ms. Il continue à décroître même si l'on applique continûment le stimulus. Cette désensibilisation a lieu en présence de Ca^{2+} dans le milieu. Ce phénomène est clairement contrôlé par des ions calciques qui modifient la probabilité d'ouverture des canaux contrôlés par l'AMPc. Elle est divisée par environ 100 lorsque la membrane est baignée par une solution intracellulaire contenant $3\mu\text{M}$ de Ca^{2+} (Zuffall et al., 1991). Ce n'est ni l'amplitude du courant élémentaire s'écoulant au travers des canaux ioniques, ni leur durée d'ouverture qui sont modifiées mais seulement la fréquence de leurs ouvertures qui croît. En fait, la concentration calcique intracellulaire agit sur l'affinité du canal pour l'AMPc. On montre que cette modulation n'impliquant ni la mise en jeu de phosphorylations, ni celle de la calmoduline, pourrait dépendre d'un facteur encore non identifié (Balasubramanian et al, 1996).

4. Conclusion de la première partie

Cette rapide introduction bibliographique nous a permis de rappeler certaines des données neurobiologiques qui caractérisent la physiologie et l'environnement des neurones récepteurs olfactifs des vertébrés. Parmi les plus importantes, nous avons, d'une part, constaté l'existence d'une chimiotopie périphérique chez certaines espèces. Nous avons également entrevu une organisation anatomique convergente des projections des fibres primaires sur les glomérules olfactifs.

D'autres données alimentent plus directement la description de la sélectivité ou des propriétés de discrimination des neurones récepteurs olfactifs. Nous avons, en particulier, constaté que le répertoire des récepteurs olfactifs est vaste. Sa diversité et son adaptation aux conditions de vie, aérienne et aquatique, des vertébrés, suggère qu'il puisse contenir des récepteurs fortement sélectionnés, dont certains à haute spécificité pour, probablement, reconnaître certains signaux à de très faibles concentrations. Mais pour l'essentiel, la spécificité de ces récepteurs reste ignorée.

Pour l'instant, deux voies de transduction olfactive ont été identifiées. La voie AMPc est peu ou pas mobilisée pour la transduction de l'acide isovalérique, de la triméthyl amine, du lyral ou du lilal, mais elle l'est beaucoup pour le cinéole ou l'acétate d'isoamyle. Fait suggestif, la voie IP3 se comporte de manière symétrique. Ces observations suggérant qu'au-delà de la sélectivité des récepteurs aux odeurs, les mécanismes de transduction partagent aussi l'espace des odeurs! Au surplus, ces deux voies de transduction pourraient être présentes simultanément au moins dans certains des neurones olfactifs étudiés. Cette complexité supplémentaire confèrerait probablement aux neurones récepteurs des capacités de discrimination ayant un fort intérêt dans la reconnaissance des mélanges.

Au cours du chapitre suivant, nous tentons d'examiner comment nos propres résultats expérimentaux corroborent ces données, ou comment ils les complètent.

DEUXIEME PARTIE: DES REPRESENTATIONS NERVEUSES DES ODEURS

1. Résultats expérimentaux relatifs au modèle amphibien

1.1. Encodage périphérique

1.1.1. Cadre et principes de l'étude de la discrimination des odeurs par les neurones récepteurs olfactifs

Nous avons d'abord cherché à caractériser les propriétés de discrimination des cellules réceptrices de la muqueuse olfactive. Cela consistait à poursuivre des travaux entrepris par nos prédécesseurs chez des amphibiens (Gesteland et al., 1963, Duchamp et al., 1974, Getchell, 1974, Revial et al., 1978a,b), puis à réaliser une étude de même type chez un mammifère, la souris.

La complexité du monde chimique à percevoir par un système olfactif est extrêmement grande. Pour la situer, on trouve souvent dans la littérature un nombre situé entre 10 000 ou 100 000 représentant le nombre des molécules connues qui, selon leurs caractéristiques physico-chimiques - poids moléculaires, volatilité etc...-, sont susceptibles d'atteindre l'organe récepteur olfactif, et donc, de constituer des stimulus pour le système olfactif. Cette évaluation est, certes, maladroite. Afin de donner une meilleure idée de cette complexité, nous proposons de rappeler que les mélanges simplement binaires de 10 000 molécules, prises à une seule concentration, constituent près de 50 millions d'autres sources odorantes, (c'est à dire les combinaisons de 2 stimulus parmi 10000), (pour la plupart) différentes entre elles et dont l'odeur diffère de celles de leurs composantes. Ajoutons, pour faire bonne mesure, qu'un "jus" de parfum peut contenir plusieurs centaines de composés.

Confronté à cet univers chimique, le dispositif d'un système olfactif efficace doit être capable d'abord de détecter un signal chimique, la substance odorante, puis, de la discriminer d'autres, c'est à dire d'extraire une information caractéristique du signal en vue de le différencier d'autres signaux. Ces deux actions, détection et discrimination, peuvent être considérées comme des capacités primordiales inhérentes à tout système de capture d'information, en particulier, aux systèmes biologiques sensoriels. Quand nous parlons ici d'extraction, cela sous-entend, qu'il faut rendre disponible pour le système de traitement une information caractéristique, former un message caractéristique du signal chimique. Autrement dit, notre propos, ici, consiste à examiner comment des signaux chimiques différents évoquent des messages nerveux différents. Cela consistait d'abord à décrire les réponses des cellules réceptrices à de multiples substances odorantes, réponses électrophysiologiques accessibles au neuro-physiologiste interrogeant, directement, une à une, les cellules d'entrée ou transducteurs du système olfactif. Notons que, parce que nous avons choisi d'enregistrer des potentiels d'action, c'est une image du message transmis aux bulbes olfactifs que nous recueillons.

Ainsi, nous différencions deux types d'informations à analyser. Les unes sont relatives à la chimie de l'interaction entre le stimulus odorant et le récepteur olfactif, les autres sont relatives à l'encodage du signal chimique par le système nerveux olfactif. Notre investigation conduit d'abord à préciser le type d'interaction entre les signaux chimiques et le système récepteur dont dépend l'encodage olfactif. Pour simplifier, disons, qu'on cherche alors à se forger une idée de la manière dont le système olfactif "regarde" le stimulus chimique. Mais c'est

aussi munis de la description de la sélectivité des neurones étudiés que nous considérerons les principes de la discrimination qui mettent en jeu un niveau supérieur d'organisation, ceux qui régissent les messages émis par la muqueuse olfactive consécutifs aux stimulations chimiques et qui s'inscrivent dans le réseau nerveux qui supporte l'information olfactive.

Compte tenu de la grande diversité chimique des supports de signaux odorants et de la durée moyenne des contacts possibles avec les neurones récepteurs olfactifs, l'exploration des propriétés de discrimination de ces cellules sensorielles s'est déroulée en plusieurs groupes successifs d'expériences. Dans toutes les études que nous avons réalisées sur la muqueuse de grenouille, le protocole d'enregistrement était identique, seuls les stimulus ont varié. En bref, il s'agissait d'introduire une électrode extracellulaire métallique (Gesteland et al., 1959) dans la muqueuse olfactive d'une grenouille, décérébrée et démyélinisée, en survie à 13°C, pour prendre contact avec une cellule réceptrice. Le contact étant établi, une série d'une vingtaine de stimulations chimiques en phase gazeuse était délivrée au-dessus de l'organe sensible. Les variations de fréquence des potentiels de pointe émis par la cellule nous renseignent sur la sensibilité de cette cellule réceptrice aux stimulus successivement délivrés. Nous appelons "profil de sensibilité" d'un neurone récepteur olfactif, la description par extension du sous-ensemble des stimulus odorants qui l'activent. Cette procédure d'enregistrement était pratiquée plusieurs dizaines de fois au cours de chaque étude: Disposant des profils de sensibilité de multiples neurones récepteurs, il est possible de comparer statistiquement les propriétés stimulantes des stimulus. Dans le principe de nos analyses, calculs de corrélation entre l'amplitude des réponses ou comparaisons de distribution de réponses aux stimulus dans l'échantillon de cellules enregistrées, analyses des correspondances et taxinomies, c'est une mesure de distance entre les stimulus qui est considérée. Deux stimulus sont d'autant plus proches ou similaires que le sous-ensemble de neurones récepteurs qui répondent à l'un et à l'autre est grand. La comparaison des neurones récepteurs entre eux utilise une procédure symétrique.

Six groupes ou séries d'expériences ont été menées dans notre laboratoire. J'ai assumé les 3 dernières qui répondent chacune à des objectifs différents, et qui sont rapportées dans quatre articles, 1, 2, 3, 4 ci-dessous, publiés en anglais. Comme nous l'avons annoncé, chaque article ou groupe d'articles inséré dans notre texte est précédé d'un résumé qui précise les objectifs de chaque étude, rend compte rapidement de l'information publiée et expose ses implications dans le cadre de notre thèse.

1.1.2. Etude de la discrimination d'une série de stimulus terpéniques et effets de la concentration

1.1.2.1 Résumé

Dans les articles reproduits aux paragraphes 1.1.2.2 et 1.1.2.3, les résultats de cette série d'expériences sont rapportés en même temps que celle d'une série antérieure à laquelle nous n'avons pas directement contribué. En résumant ci-dessous, les résultats d'une des séries et leur analyse, nous rapportons, de fait, les observations et des commentaires généralisables aux séries antérieures. Cette description est évidemment complétée par les particularités de la présente série.

Cette série d'expériences a été l'occasion d'une collaboration avec Ernest Polak, chimiste et expert de l'industrie des arômes alimentaires, qui a proposé d'examiner un groupe de molécules particulières, terpéniques, présentant des variations structurales "graduées"

autour d'un squelette à 10 atomes de carbone. Selon les cas, ces stimulus ont des odeurs évoquant les agrumes, la menthe ou se rapprochent des odeurs des dérivés pétroliers. De plus, certains produits odorants ont été proposés à deux concentrations différentes, ce qui a permis d'examiner l'influence de l'intensité du stimulus sur les mesures de distance. Des deux articles insérés dans les deux paragraphes suivants, nous avons extrait les informations remarquables relatives à la série d'expérience sur les produits terpéniques et les résumons ici. Cette étude a aussi eu la particularité d'être doublée d'une étude, parallèlement menée par A. Duchamp, sur les neurones bulbaires, que nous présenteront ultérieurement.

Nous avons d'abord confirmé un certain nombre d'observations antérieures:

- La plupart des neurones récepteurs olfactifs enregistrés ont une activité de repos non nulle, plus de la moitié des cellules ayant une activité spontanée inférieure à 20 P.A./min. Une augmentation transitoire de l'émission de potentiels d'action consécutive à la stimulation, ne dépassant, en crête, qu'exceptionnellement 1200 P.A. par seconde, est considérée comme l'indication d'une sensibilité de la cellule enregistrée au stimulus délivré (Fig. 16). On note aussi l'existence de réponses par inhibition. Ici, une seule a été confirmée par l'étude de sa reproductibilité.

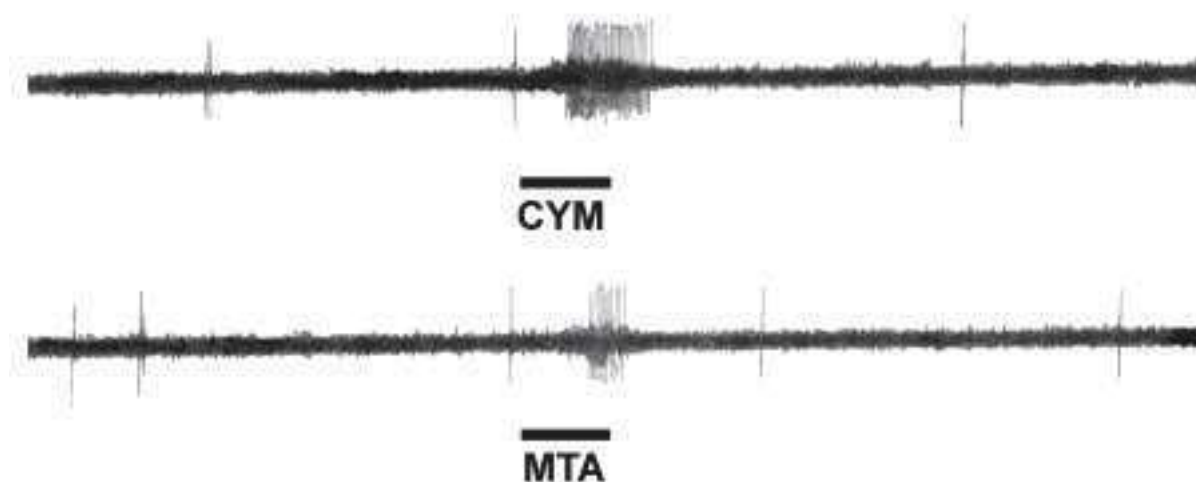


Figure 16: Enregistrement unitaire extracellulaire. Exemples de réponses d'un neurone récepteur olfactif de grenouille au para-cymène (CYM) et au menthane (MTA). La barre représente la stimulation appliquée pendant 2 s.

Compte tenu des caractéristiques de la distribution des potentiels de pointe au repos, il est risqué de comptabiliser ces réponses sans s'assurer de leur reproductibilité. On peut penser que nous sous-estimons leur nombre. L'intensité des réponses (en terme de P.A./s) à un même stimulus est variable d'une cellule à une autre. Un nombre non négligeable de cellules ne répond à aucun des 19 stimulus testés, atteignant ici 13% (7/53). En moyenne, les cellules ont répondu à 8 stimulus, les confondant donc souvent (si l'on fait abstraction des modulations possibles de fréquence des trains de potentiels de pointes émis qui pourraient fonder une base de discrimination).

- Toutes les substances testées sont distinguées pourvu qu'on considère les profils de sensibilité d'un certain nombre de neurones récepteurs. Par exemple, des isomères de position comme la

quinoline et l'isoquinoline sont clairement distingués par 4 neurorécepteurs olfactifs qui répondent exclusivement à l'un ou l'autre, alors que 9 cellules sont sensibles à ces deux odorants. Onze cellules distinguent le diméthyl-styrène du para-cymène, 22 les confondent et 20 y sont simultanément insensibles... Ainsi, si la grenouille est capable de discriminer ces odorants, on peut considérer que c'est parce que chacun active un sous-ensemble distinct, caractéristique de neurorécepteurs olfactifs. En tout cas, il y a bien là un message nerveux transmis aux bulbes olfactifs qui est **caractéristique** du signal chimique. Nous ne savons cependant pas ce qui en sera retenu aux niveaux supérieurs.

- Il existe toujours un certain nombre de neurones qui sont simultanément sensibles à deux odorants donnés et qui semblent donc les confondre. Ces confusions trahissent vraisemblablement le partage de mécanismes de reconnaissance. On conçoit que c'est parce qu'elles existent que se manifestent au niveau de la perception d'éventuelles communautés d'odeur.

Lorsque, à l'aide de l'analyse factorielle de correspondances, on représente de manière synthétique l'ensemble des interrelations entre les odorants testés durant une série, ils se répartissent dans un espace multidimensionnel, que nous nommons "espace olfactif périphérique" (Fig. 17). Les points représentatifs de substances odorantes montrant une communauté d'action se regroupent dans une portion de cet espace, dont nous ne représentons qu'une partie au moyen des projections factorielles (ici 50,4% de la variance totale avec 4 axes). Nous confirmons les regroupements par l'analyse taxinomique qui, elle, tient compte de toute la variance apportée par la matrice de données. De plus, nous montrons, à l'aide de comparaisons par paires, ici, au moyen du calcul de l'écart réduit (Fig. 18), ou du coefficient de corrélation dans l'article, qu'à ces regroupements correspondent des liens statistiques significatifs.

Si on résume les résultats de la présente série, on observe deux regroupements évidents:

- La paire quinoline-isoquinoline,
- et le groupe des molécules terpéniques comprenant, le para-cymène, de diméthyl styrène, le D-limonène, l' α -terpinène, le menthane et le menthène.

On remarque aussi le relatif isolement du 1,8-cinéole, de l'hexenal, du d-menthol ou de l' α -méthyl-pyrrole. L'indépendance du cinéole est grande, et cette molécule à odeur de camphre est un pôle sur lequel le premier axe factoriel est construit. Dans le plan factoriel construit avec les facteurs 1 et 2, on remarque sa proximité avec le d-menthol. L'autre extrémité de l'axe 1 est associée au cyclohexane carboxaldéhyde, et au benzaldéhyde. Le deuxième axe factoriel extrait le groupe des six dérivés terpéniques, déjà mentionnés, et qui ont tendance à recruter la réponse des mêmes neurones récepteurs. Le troisième axe extrait le seul composé linéaire de la série, l'hexenal, tandis que le 4^{ième} axe est fortement lié au d-menthol qu'il individualise.

Un intérêt particulier de cette série réside dans le fait que nous avons testé aussi sur les mêmes cellules deux concentrations de cinq des dix-neuf substances étudiées. Comme on peut s'y attendre le recrutement de réponses dépend de la concentration. Par exemple, pour le benzaldéhyde, la plus faible concentration évoque 15 réponses sur 30 cellules étudiées, et on assiste à un recrutement de 7 cellules nouvelles (soit un gain de 46%) en multipliant la concentration du stimulus par 2,5. Les cellules répondant à la plus faible concentration répondent toutes à la plus forte. Par contre, certaines cellules répondant à la plus forte concentration ne répondent pas à la plus faible: On peut généraliser cette observation en disant que le recrutement de cellules est d'autant plus important que l'intensité de la stimulation est

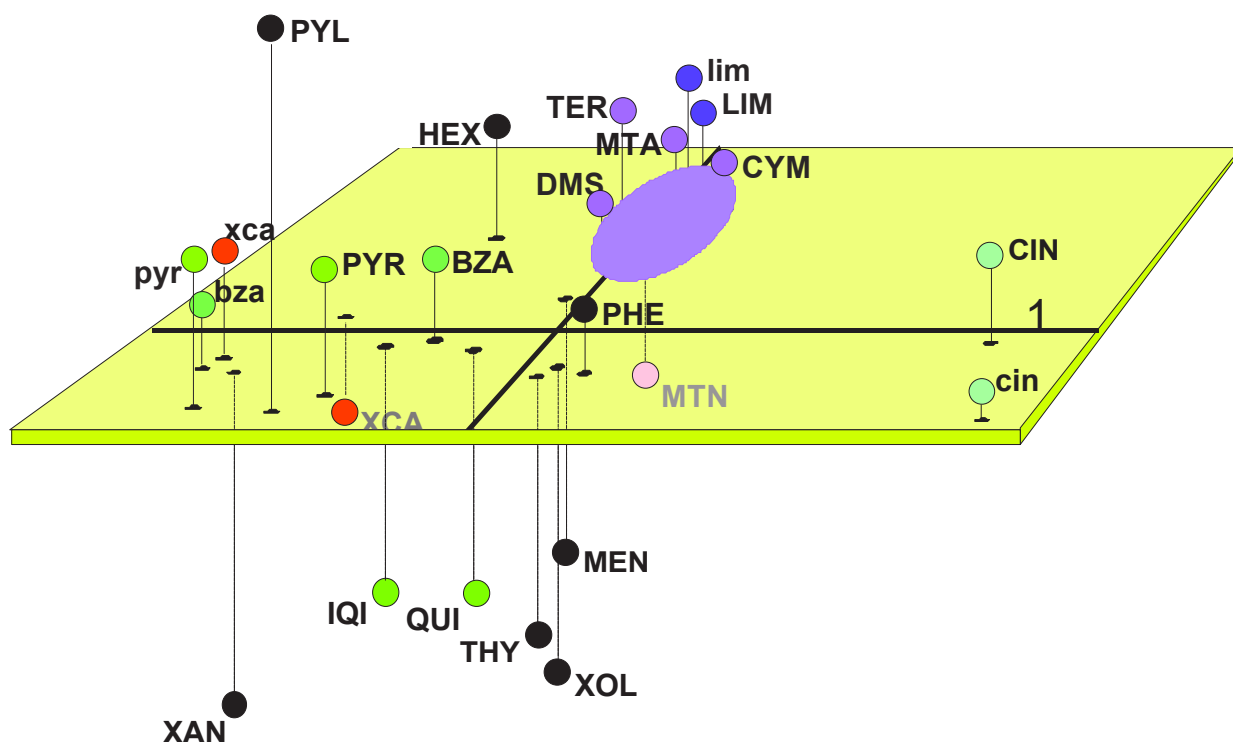


Figure 17: Espace factoriel issu de l'analyse des correspondances des profils de sensibilité de 43 neurones récepteurs olfactifs de grenouille vis à vis de 19 odorants, dont 5 présentés à deux concentrations. Les concentrations les plus faibles sont représentées par des sigles en minuscules. QUI, quinine, IQI, isoquinoline, MTN, menthène, MTA, para-menthane, LIM, D-limonène, TER, α -terpinène, CYM, para-cymène, DMS, diméthyl-styrène, MEN, menthol, PHE, phénol, THY, thymol, XOL, cyclohexanol, XAN, cyclohexane, XCA, cyclohexane carboxaldéhyde, HEX, hexénal, CIN, 1,8-cinéole, BZA, benzaldéhyde, PYL, α -méthyl-pyrrole, PYR, pyridine. Les trois premiers facteurs représentent respectivement 16,1%, 13,7% et 11,3% de la variance totale.

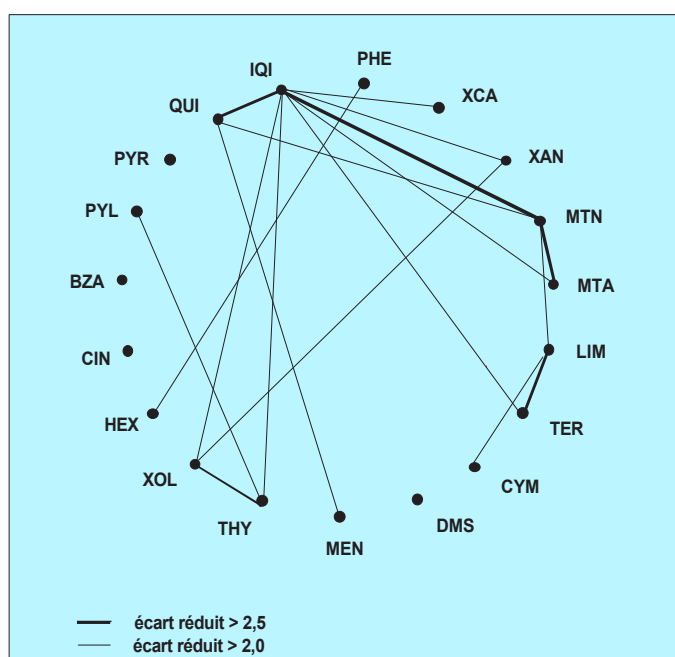


Figure 18: Similitudes significatives entre les propriétés stimulantes de différents odorants. L'écart-réduit permet de comparer les distributions des réponses évoquées par chaque paire d'odorants dans l'échantillon de neurones récepteurs étudiés. Un trait d'épaisseur d'autant plus importante que la similitude est forte relie les odorants qui ont statistiquement des propriétés stimulantes semblables.

plus grande. Ce principe a été confirmé plus tard (Duchamp-Viret et al., 1990).

Cette variation du nombre a pour effet de modifier le sous-ensemble de neurones récepteurs qui caractérise l'odorant, donc les rapports (de distance) entre les odorants (Fig. 17). On conçoit que cette modification puisse expliquer les variations de qualité de l'odeur perçue d'une source odorante en fonction de sa concentration, telles qu'on peut effectivement les observer (Gross-Isserof, 1988). Il est cependant plus intéressant de considérer la proposition inverse: Comment de telles variations ne remettent-elles pas en question la qualité de la perception, ce qui aussi est observé? Il s'agit là en fait d'un type de problème que les physiologistes n'ont pas longuement abordé: Le système olfactif comme tous les systèmes sensoriels extrait un message des signaux qu'il reçoit, mais comment? Nous reviendrons ultérieurement à cette importante question, après avoir fait le compte rendu de ce qui se passe au niveau du deuxième neurone, la cellule mitrale des voies olfactives.

1.1.2.2. Article 1: Revial, M-F., Sicard, G., Duchamp, A., and Holley, A. New studies on odour discrimination in the frog's olfactory receptor cells. I Experimental results. Chem. Senses, 1982, 7:175-190.

1.1.2.3. Article 2: Revial, M-F., Sicard, G., Duchamp, A., and Holley, A. New studies on odour discrimination in the frog's olfactory receptor cells. II Mathematical analysis of electrophysiological responses. Chem. Senses, 1983, 8:179-184.

1.1.3. Etude d'un groupe particulier: le groupe des molécules à odeur de camphre

1.1.3.1 Résumé

Cette étude a été envisagée en collaboration avec Maurice Chastrette, chimiste, afin d'enrichir et de mieux définir un groupe d'odorants présentant une odeur de camphre plus ou moins intense pour le sujet humain. Rassemblant une dizaine de tels produits, elle permettait aussi d'observer "à la loupe" une portion restreinte de l'espace olfactif.

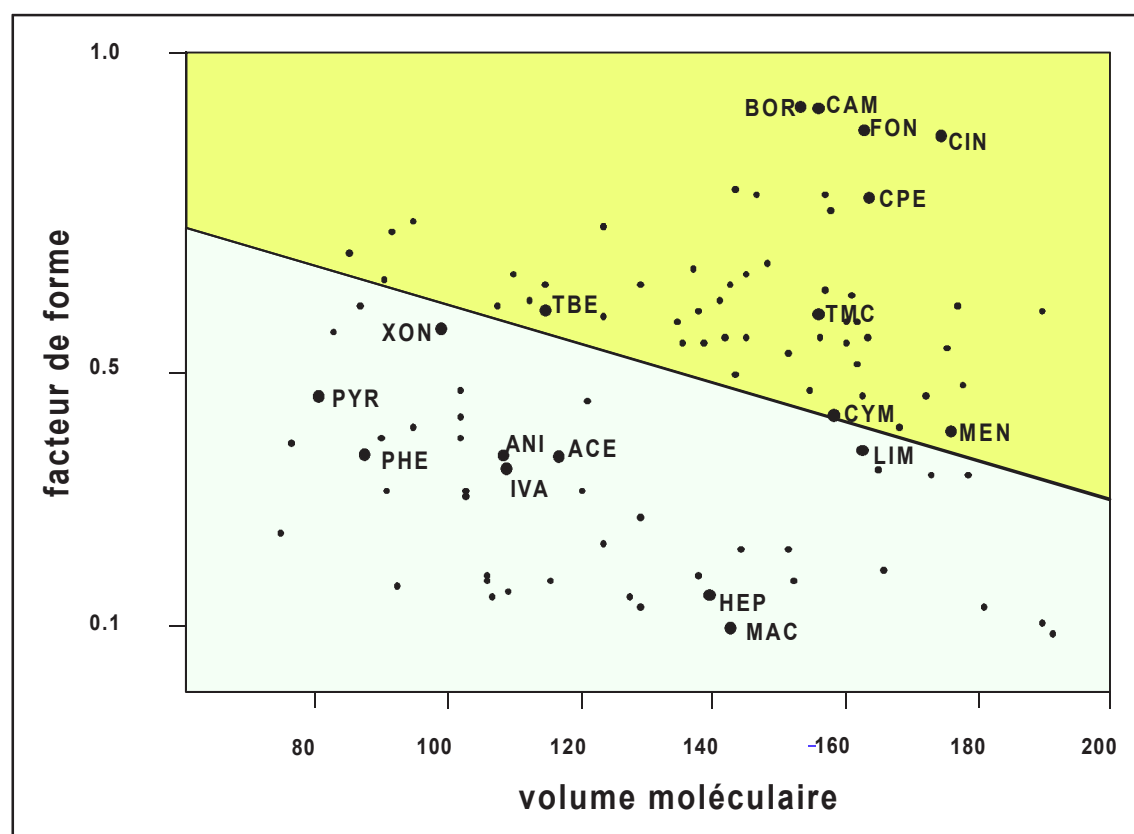


Figure 19: Discriminer des odorants camphrés grâce à une fonction de la forme et du volume moléculaires. La fonction de discrimination a été calculée sur la base de deux sous-ensembles d'odorants comprenant 49 molécules chacun (D'après Eminet et Chastrette, 1983). Seuls les points représentatifs des stimulus utilisés au cours de l'expérience chez la grenouille sont indiqués. Cette fonction est utilisable pour prévoir la note odorante camphrée d'une molécule connaissant sa forme et son volume moléculaires. Le paramètre de forme est le rapport des trois axes de l'ellipsoïde dans lequel s'inscrit la molécule a/bc . La séparation entre le territoire des camphrés et celui des non-camphrés correspond aux valeurs nulles (alignées) de la fonction de discrimination. Selon les auteurs, le modèle admet quelques imperfections, le *para*-cymène (CYM), n'évoque pas d'odeur de camphre, ni le tétra-bromo éthane (TBE), ni le menthol (MEN). Pour les récepteurs olfactifs de grenouille, le tétra-bromo éthane et le menthol sont compris ou très proches des "camphrés". Ça n'est pas le cas du *para*-cymène. Cependant, on peut constater d'après les réponses des neurones récepteurs olfactifs de grenouille que ces neurones font un travail de discrimination très voisin!

D'après Eminet et Chastrette, (1983), les molécules "camphrées" ont en commun leur forme sphérique et leur volume, plutôt petit (Fig. 19). La surface de ces molécules est peu réactive, les interactions se faisant grâce aux forces de Van der Waals, concentrées sur la surface sphérique. Leurs ressemblances sous-entendent que des mécanismes de reconnaissance

périphérique devraient les confondre souvent. Nous avons donc sélectionné quelques-unes de ces molécules pour confronter l'hypothèse de ces auteurs à la réalité neurobiologique.

La procédure utilisée est semblable à celle que nous avons exposée au paragraphe 1.1.1. Nous décrivons ici donc seulement les molécules utilisées et les résultats de l'étude publiée et dont on trouvera la copie insérée au paragraphe suivant.

Vingt composés ont été délivrés en phase gazeuse à des concentrations plutôt fortes, environ 1/10^{ème} de leurs vapeurs saturantes. Parmi eux, on a introduit trois paires représentant divers groupes d'odorants déjà identifiés aux cours des expériences précédentes: la paire anisole / acétophénone, la paire méthyl amyl-cétone / heptanol et la paire d-limonène/ para-cymène. Pour le complément, on a introduit des molécules plus ou moins camphrées, jugées éventuellement seulement voisines (menthol, cyclohexanone). Certains camphrés avaient déjà été étudiés: Le 1-8 cinéole (ou eucalyptol), le camphre et l'isobornéol, avaient été appariés par les neurorécepteurs au cours d'études antérieures (Duchamp et al., 1974, Revial et al., 1982). L'adamantane, molécule parfaitement sphérique et couverte d'atomes d'hydrogène, est faiblement réactive. Le tétra-bromo éthane est aussi sphérique mais d'un diamètre plus faible. Plusieurs odorants testés sont construits sur un squelette bicyclo-pentane: le camphre, le fenchol, la fenchone, l'iso-bornéol, le bornéol, le camphène. On suppose que la cyclodécane également testée, molécule souple, peut adopter une configuration de géométrie voisine de celle des molécules précédentes. Enfin, on a ajouté une série de cyclo-hexanones, dont la cyclohexanone, la 2,5-diméthyl-cyclohexanone et la 3,3,5-triméthyl cyclohexanone. Cette dernière molécule présente une calotte hémisphérique tapissée d'atomes d'hydrogène dont le volume est voisin de celui requis pour assurer l'appartenance au groupe des molécules camphrées.

Nous avons aussi profité de cette nouvelle étude pour repérer précisément les sites d'enregistrements, afin d'étudier à l'échelle unitaire, l'implication de la l'hétérogénéité spatiale de la sensibilité de la muqueuse olfactive telle qu'on l'a décrite sur la base des enregistrements EOG (Daval et al., 1980; Mackay-Sim et al., 1982).

Cinquante sept neurones récepteurs ont répondu à un stimulus au moins, sur les 71 que nous avons testés au cours de ce travail. Le calcul de l'écart réduit permet de constater que le seuil de 2 est dépassé pour de multiples paires d'odeur: On montre donc que les distributions de réponses ne sont pas indépendantes au risque de 5%, et on suppose que ceci est le fait d'un partage de mécanismes de détection communs (Fig. 21).

Comparant les distributions spatiales des sensibilités aux différents odorants (Fig. 20), quel que soit le stimulus, nous n'avons pas trouvé de différence significative entre les trois différents territoires antérieurs, médians et postérieurs, ni en comparant les portions droites et gauches, d'ailleurs.

Relativement à la discrimination des stimulus, on note la densité des liaisons entre le camphène, le camphre, la fenchone, la 3,3,5-triméthyl cyclohexanone, l'adamantane, le fenchol, l'iso-bornéol, le bornéol de cyclodécane et même le menthol. On remarque au contraire un relatif isolement du cinéole par rapport à ces corps. Les paires limonène/ *para-cymène* et anisole / acétophénone sont confirmées. La complexité du graphe nous invite à utiliser une représentation plus synthétique pour représenter les données: Nous choisissons ici de montrer la taxinomie, non hiérarchique, qui fait apparaître l'individualité du groupe "camphré" dès la deuxième et à la troisième partitions (Fig. 22). On note l'exclusion de la 2,4 diméthyl-cyclohexanone, de la cyclodécane et de la cyclohexanone de ce groupe. Les paires heptanol / méthyl amyle cétone, D-limonène / *para-cymène* et anisole / acétophénone sont individualisées.

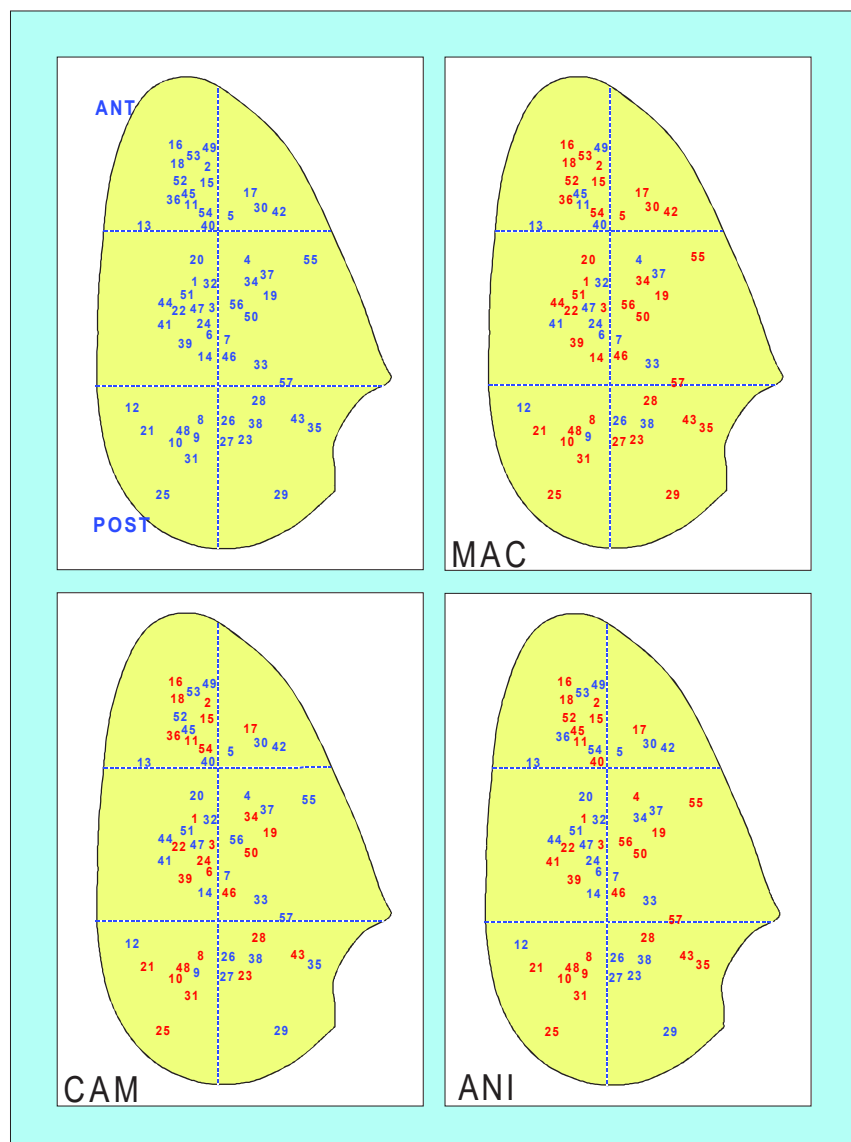


Figure 20: Distribution des neurones récepteurs de la muqueuse ventrale de grenouilles dont nous avons testés la sensibilité à vingt corps purs odorants. A titre d'exemple trois cartes parmi les vingt obtenues sont représentées. En caractères rouges sont indiquées les unités ayant répondu au stimulus indiqué en bas à gauche. MAC: 2-heptanone, CAM, camphre, ANI, anisole. L'analyse de ces distributions n'a pas fait apparaître de trace d'une chimiotopie périphérique.

Si les molécules "camphrées" se rassemblent, à cause de l'insertion de l'adamantane ou du camphène dans le groupe, on peut supposer que ce n'est pas du fait d'une liaison polaire avec leurs récepteurs, et, plus indirectement, que cette liaison n'est pas nécessaire à la manifestation de l'odeur de camphre. Comme toutes les molécules qui appartiennent au groupe sont discriminées, c'est à dire recrutent des sous-ensembles différents de neurones récepteurs, le système de récepteurs découvre cependant leurs particularités. Le tétra-bromo-éthane est aussi sphérique mais d'un volume plus petit que celui requis pour présenter la note camphrée, selon Eminet et Chastrette. Ils remarquent que leur fonction de discrimination classe mal le tétra-bromo éthane, le menthol et le para-cymène (compte tenu de la description de leurs odeurs, non camphrées). Or cette molécule est ici en périphérie du groupe. Ce résultat est cohérent avec la disposition du point représentatif, proche de la droite de discrimination,

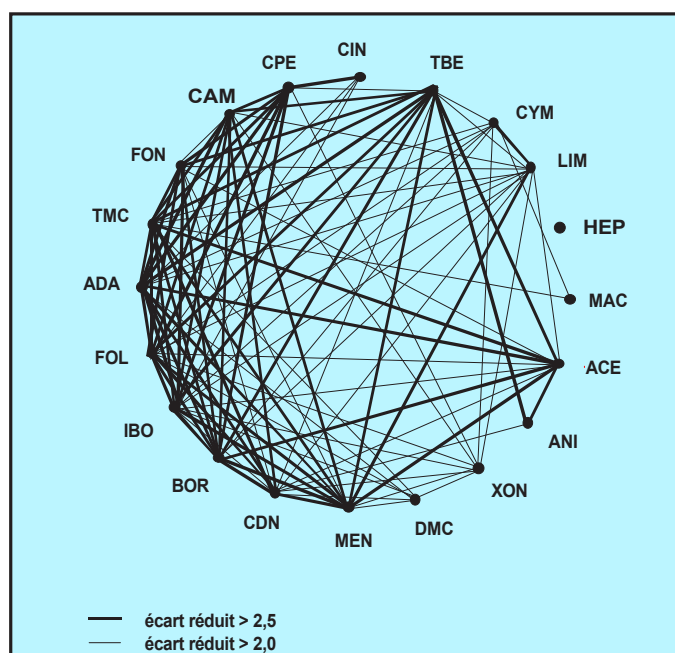


Figure 21 : Similitudes significatives entre les propriétés stimulantes de différents odorants.

L'écart-réduit permet de comparer les distributions des réponses évoquées par chaque paire de d'odorants dans l'échantillon de neurones récepteurs étudiés. Un trait d'épaisseur d'autant plus importante que la similitude est forte relie les odorants qui ont statistiquement des propriétés stimulantes semblables.

HEP, heptanol, MAC, 2- heptanone, LIM, D-limonène, CYM, para-cymène, ACE, acétophénone, ANI, anisole, CDN, cyclodécane, DMC, 2,4-diméthyl cyclohexanone, XON, cyclohexanone,, CIN, 1,8-cinéole, FOL, Alcool fenchylique, IBO, iso-bornéol, CAM, dl-camphre, TMC, 3,3',5 -triméthyl cyclohexanone, ADA, adamantane, BOR, bornéol, MEN, menthol, TBE, tétra-bromo-éthane, FON, fenchone.

NIVEAUX	1	2	3	4	5	6	7	8
n-Heptanol	HEP	HEP	HEP	HEP	HEP	HEP	HEP	HEP
Méthyl-amyl cétone	MAC	MAC	MAC	MAC	MAC	MAC	MAC	MAC
D-Limonène	LIM	LIM	LIM	LIM	LIM	LIM	LIM	LIM
p-Cymène	CYM	CYM	CYM	CYM	CYM	CYM	CYM	CYM
Acétophénone	ACE	ACE	ACE	ACE	ACE	ACE	ACE	ACE
Anisole	ANI	ANI	ANI	ANI	ANI	ANI	ANI	ANI
Cyclodécane	CDN	CDN	CDN	CDN	CDN	CDN	CDN	CDN
2,5-diméthyl Cyclohexanone	DMC	DMC	DMC	DMC	DMC	DMC	DMC	DMC
Cyclohexanone	XON	XON	XON	XON	XON	XON	XON	XON
1-8-Cinéole	CIN	CIN	CIN	CIN	CIN	CIN	CIN	CIN
Fenchol	FOL	FOL	FOL	FOL	FOL	FOL	FOL	FOL
Camphène	CPE	CPE	CPE	CPE	CPE	CPE	CPE	CPE
iso-Bornéol	IBO	IBO	IBO	IBO	IBO	IBO	IBO	TBE
dl-Camphre	CAM	CAM	CAM	CAM	CAM	CAM	CAM	CAM
3,3,5-triméthyl Cyclohexanone	TMC	TMC	TMC	TMC	TMC	TMC	TMC	TMC
Adamantane	ADA	ADA	ADA	ADA	ADA	ADA	ADA	ADA
Bornéol	BOR	BOR	BOR	BOR	BOR	BOR	BOR	BOR
Menthol	MEN	MEN	MEN	MEN	MEN	MEN	MEN	MEN
Tétra-bromo éthane	TBE	TBE	TBE	TBE	TBE	TBE	TBE	IBO
Fenchone	FON	FON	FON	FON	FON	FON	FON	FON

Figure 22: Classification de vingt stimulus odorants sur la base des réponses de neurones récepteurs olfactifs de grenouilles. Taxinomie non hiérarchique descendante d'après Emptoz et Fages, 1980. A chaque niveau N, on a la partition en N classes. La variance active totale diminue exponentiellement du niveau 1 au niveau 8 et ne varie plus significativement entre le niveau 7 et le niveau 8.

dans le plan paramètre de forme / volume moléculaire. C'est aussi le cas du menthol. Il est bien sûr possible d'envisager, que bien que répondant aux critères de forme et de volume, d'autres attributs physico-chimiques, radicaux, brome ou hydroxyle, puissent prévaloir et soient responsables de qualités d'odeur différentes. D'après le calcul des écarts réduits, on sait que le para-cymène partage des récepteurs qui reconnaissent aussi des molécules camphrées, mais 3 neurones récepteurs sont sensibles à ce stimulus sans manifester de sensibilité à l'une des molécules camphrées, 3 autres répondant aussi au para-cymène ne sont sensibles qu'à une seule des molécules camphrées... Toute discrimination peut évidemment suffire à conférer une autre qualité au stimulus.

1.1.3.2. Article 3: Sicard, G. Olfactory discrimination of structurally related molecules: Receptor responses to camphoraceous odorants. Brain Research, 1985, 326:203-212.

1.1.4. Récapitulation: Etude des relations entre plusieurs groupes d'odorants

1.1.4.1. Résumé

En 1980, l'exploration de l'espace olfactif comprenait quatre séries d'expériences qui avaient permis d'examiner environ soixante molécules odorantes. Au cours de chaque série d'expérience, différents groupes d'odeurs avaient été identifiés. Notre objectif était alors de rassembler dans une même série d'expériences des représentants des groupes principaux pour tester la reproductibilité des regroupements et pour juger des relations entre les groupes. La série de substances odorantes testées serait proposée comme un échantillon de référence pour des études s'adressant à d'autres espèces animales ou à d'autres niveaux du système olfactif.

L'étude est détaillée dans l'article ci-dessous. On peut résumer ainsi cette étude:

- Soixante quatorze cellules ont été soumises chacune à 20 stimulations qualitativement différentes. Les stimulus utilisés étaient: l'acétophénone, l'anisole, le n-butanol, le dl-camphre, la cyclodécane, le 1,8 cinéole, le para-cymène, le d-citronellol, le n-heptanol, l'acétate d'iso-amyle, l'acide isovalérique, le d-limonène, la méthyl amyle cétone (ou 2-heptanone), le l-menthol, le phénol, le thiophénol, la pyridine, le thymol, le cyclohexanol, la cyclohexanone. Ils ont été délivrés à des dilutions des vapeurs saturantes comprises entre 1/3 et 1/20.
- Les activités spontanées sont distribuées entre 0 et 120 P.A. émis par minute.
- Les fréquences maximum sont de l'ordre de 1200 P.A. émis par minute.
- Dans cette série, 60 cellules ont répondu à au moins un stimulus de la série. En moyenne les neurones récepteurs répondaient à 8 ± 5 stimulus.

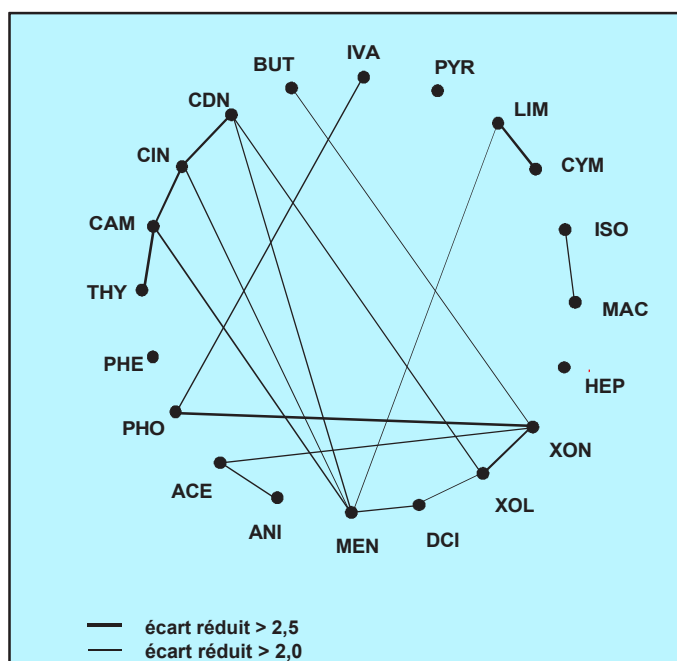


Figure 23: Similitudes significatives entre les propriétés stimulantes de différents corps purs odorants. L'écart-réduit permet de comparer les distributions des réponses évoquées par chaque paire d'odorants dans l'échantillon de neurones récepteurs étudiés. Un trait d'épaisseur d'autant plus importante que la similitude est forte relie les odorants qui ont statistiquement des propriétés stimulantes semblables.

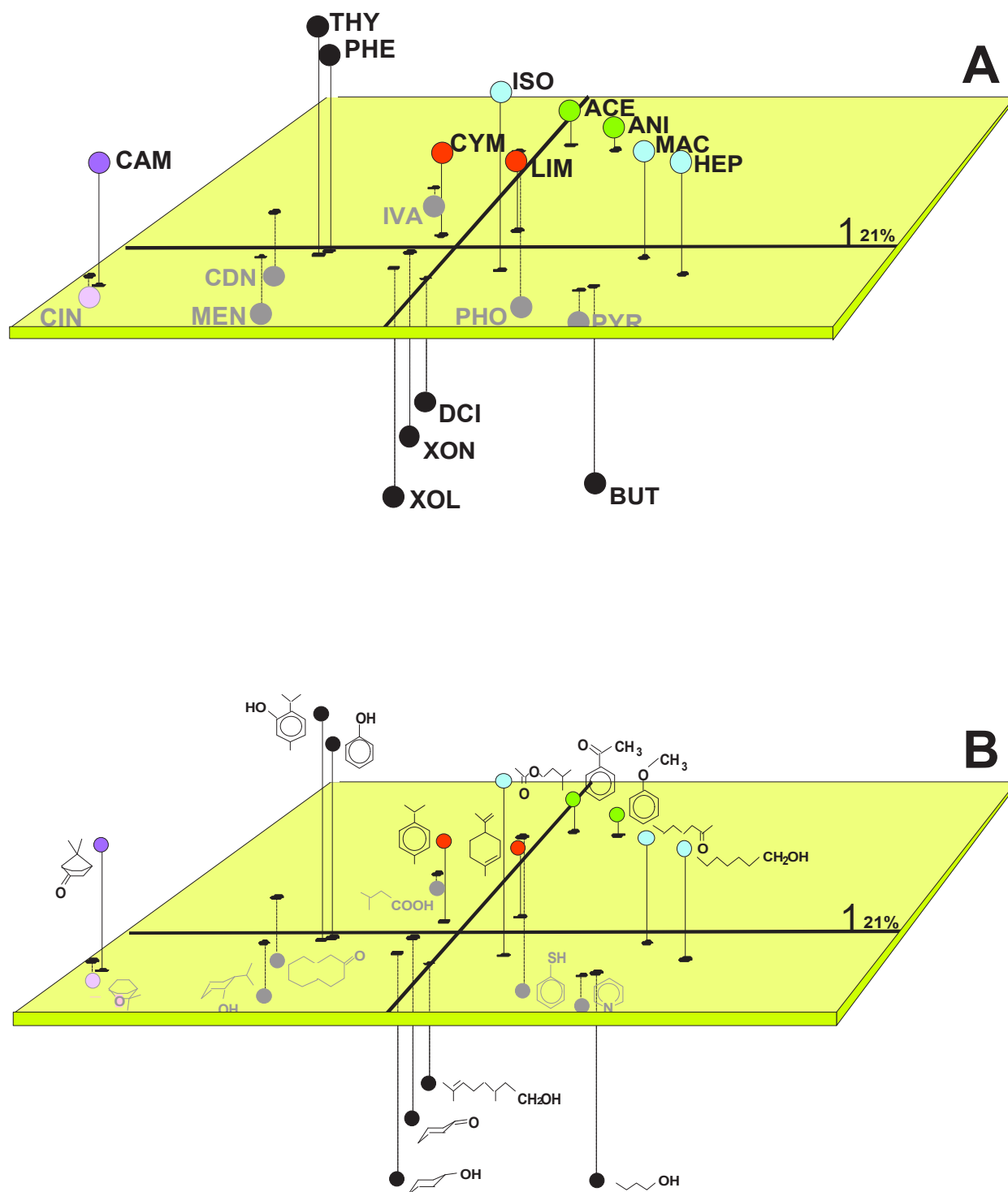


Figure 24: Espace factoriel issu de l'analyse des correspondances de vingt substances odorantes de la série récapitulative. Les profils de sensibilité de 60 neurones récepteurs olfactifs vis à vis de 20 substances odorantes représentatives des échantillons antérieurement étudiés ont été recueillis. A- En bleu les linéaires regroupés par la taxinomie, qui s'opposent aux camphrés en rose sur l'axe de plus forte variance. En vert les molécules représentatives du groupe «aromatique», et, en orangé les molécules représentatives du groupe «terpénique». B- Le même espace factoriel avec une représentation des structures chimiques. Les trois premiers axes portent respectivement 21%, 12% et 10% de la variance contenue dans la matrice de données.

- Les paires attendues sont effectivement formées (Fig. 23). Les neurones récepteurs répondent simultanément plus souvent que ne le laisse prévoir le simple hasard au couple méthyl-amyle cétone / acétate d'iso-amyle, au couple cinéole / camphre, au couple acétophénone / anisole, ou au couple para-cymène / limonène, etc... La conclusion est que ces liens sont solides, relativement indépendants des lots cellulaires échantillonnés au hasard, et résistants à des variations des conditions de stimulation (qui au cours des séries successives ont légèrement varié). Ici encore, les liens significatifs s'étendent en dehors des groupes que nous lisons sur les représentations globales, factorielles ou taxinomiques.

Un examen, même grossier, des proximités en regard des structures chimiques concernées, laisse penser que "ce qui se ressemble s'assemble": L'acétate d'iso-amyle et la méthyl-amyle cétone sont des molécules linéaires ayant le même nombre de carbones qui se regroupent, et qui s'opposent sur le premier axe factoriel à des molécules sphériques regroupées, elles aussi, comme le camphre et le cinéole (Fig. 24). La construction des modèles moléculaires du limonène et du para-cymène et leur comparaison confirment leur similitude de forme. Les représentants du groupe "aromatique", acétophénone / anisole, sont, encore une fois, proches l'un de l'autre et caractérisés par leur noyau aromatique mono-substitué. On note que ces quelques descriptions retiennent plus des éléments du squelette moléculaire que des fonctions chimiques. Parfois, le lien qui apparaît entre certaines molécules, ici, le cyclohexanone et le d-citronellol, par exemple, reste inexpliqué. (Peut-on invoquer la souplesse de la chaîne linéaire qui pourrait approcher la structure fermée du cycle hexa-carboné?)

Quoiqu'il en soit, nos observations suggèrent que les distances que nous découvrons sont bien le reflet assez direct d'interactions moléculaires entre les stimulus et leurs récepteurs. C'est bien le registre chimique qui peut servir d'explication à ces résultats (Chastrette et al., 1981, Sicard et al., 1997), même si une interprétation exhaustive n'est pas atteinte. Nous pouvons ici noter que la reproduction de l'espace des stimulus tel qu'on peut le décrire sur la base des réponses des neurones récepteurs olfactifs, n'a pu être réalisée qu'en utilisant des variables chimiques globales, comme le coefficient de partage octanol / eau ou des paramètres de forme (Chastrette et al., 1981, Sicard et al., 1997). Des tentatives avaient été déjà menées qui reliaient de tels paramètres chimiques à la perception humaine des stimulus (Döving et al., 1966, Berglund et al., 1973).

Le fait le plus remarquable que nous ayons enregistré est qu'il ne semble pas possible de fournir sur la base de nos observations une partition intelligible des neurones récepteurs eux-mêmes. Cela a des conséquences sur la manière dont nous concevons le mécanisme de réception. Considérant les profils de sélectivité des neurones récepteurs, les chimistes éprouvent quelques difficultés à décrire le mécanisme de détection commun qui peut interagir, à la fois, avec des molécules si différentes, l'heptanol et le cinéole, par exemple. A tel point qu'on a plutôt tendance à imaginer que seules des associations de récepteurs sont capables de conférer des possibilités de reconnaissance aussi variées à un même neurone récepteur. Au cours de la troisième partie, nous devons revenir sur ce constat et nous tenterons d'en tirer les conséquences en terme de propriétés des récepteurs aux odeurs eux-mêmes.

1.1.4.2. Article 4: Sicard, G. and Holley, A. Receptor cell responses to odorants: Similarities and differences among odorants. Brain Research, 1984, 292:283-296.

1.2. Transfert bulbaire

En caractérisant l'entrée et la sortie d'une boîte noire, on apprend ce que réalise la structure intercalée, on qualifie sa fonction de transfert. Nous résumons ici une étude entreprise à l'initiative d'André Duchamp à laquelle nous avons contribué, et dont la publication est insérée au paragraphe suivant, parce qu'elle démontre qu'après la capture d'informations chimiques, le système nerveux olfactif réalise une mise en forme qui renforce les capacités de discrimination du système et qui tend à s'affranchir des variations de concentration. L'intérêt de ce rappel tient aussi au fait que la littérature récente permet une lecture moins abstraite de la comparaison des deux premiers niveaux d'intégration de l'information olfactive. Nous attirons l'attention sur le fait que certaines analyses publiées ont été ici complétées.

1.2.1. Etude des modifications de la représentation périphérique par la projection et le traitement bulbaire.

Au cours de cette étude, dix neuf produits qualitativement différents, cinq d'entre eux étant proposés à deux concentrations, ont servi de stimulus. Les concentrations des stimulus les plus élevés variaient entre le cinquième et le vingtième de leurs vapeurs saturantes. On a augmenté leur dilution par le gaz vecteur pour obtenir les stimulations les moins intenses, les différences de concentrations entre éléments de chaque couple variant entre 30 à 40%.

Sommairement, le protocole a d'abord consisté à enregistrer les réponses de neurones olfactifs de la muqueuse de grenouille à ces stimulus (et dont les résultats ont déjà été exposés et commentés plus haut). La préparation, la grenouille déméduillée et décérébrée, la méthodologie, reposant sur l'usage de microélectrodes extracellulaires, et la stimulation en phase gazeuse, ont été décrites antérieurement. D'autre part, la deuxième opération consista à enregistrer les réponses dans les mêmes conditions de stimulation de neurones de la sortie bulbaire, des cellules mitrales, chez des animaux de la même espèce. On notera que la préparation qui a servi à recueillir les réponses d'unités bulbaires diffère de celle qui a servi pour l'enregistrement des neurones récepteurs. En effet, l'accès aux neurones du bulbe était aménagé après immobilisation de l'animal par une injection de D-tubocurarine, et une anesthésie locale au moyen d'hypochlorate de procaine, par ouverture chirurgicale de la boîte crânienne. Par contre, les conditions de stimulation, ouverture de la cavité nasale, disposition de l'olfactomètre et réglages des concentrations, au cours des deux séries d'expériences parallèles étaient strictement identiques.

Le constat le plus important est qu'il existe une différence des proportions de cellules recrutées soit dans le bulbe soit dans la muqueuse par un même stimulus (Fig. 25). Si l'on s'intéresse aux seules réponses transmises, c'est à dire aux activations, le pourcentage de cellules recrutées par une même stimulation est plus faible dans le bulbe que dans la muqueuse, excepté pour le limonène, le menthène, la quinoline et son isomère, et le cyclohexane et que les deux séries de pourcentages ne sont pas corrélées ($r=0,53$ non sign.) (Fig. 25A). On note que les taux d'inhibitions bulbaires sont eux corrélés ($r=0,65$, $p<0.001$) aux taux d'activations périphériques. Nous pouvons, par ailleurs, remarquer que les taux de cellules bulbaires inhibées ne sont pas systématiquement corrélés ($r=0,54$, $p=0.5$) aux taux de cellules bulbaires activées puisque, par exemple, le limonène activant 70% des cellules bulbaires interrogées n'en inhibe que 21%, alors que le cinéole recrutant 56% d'activations bulbaires évoque 30% d'inhibitions bulbaires. Ainsi, on trouve, ici, l'indication de traitements bulbaires différenciés selon les stimulus olfactifs considérés.

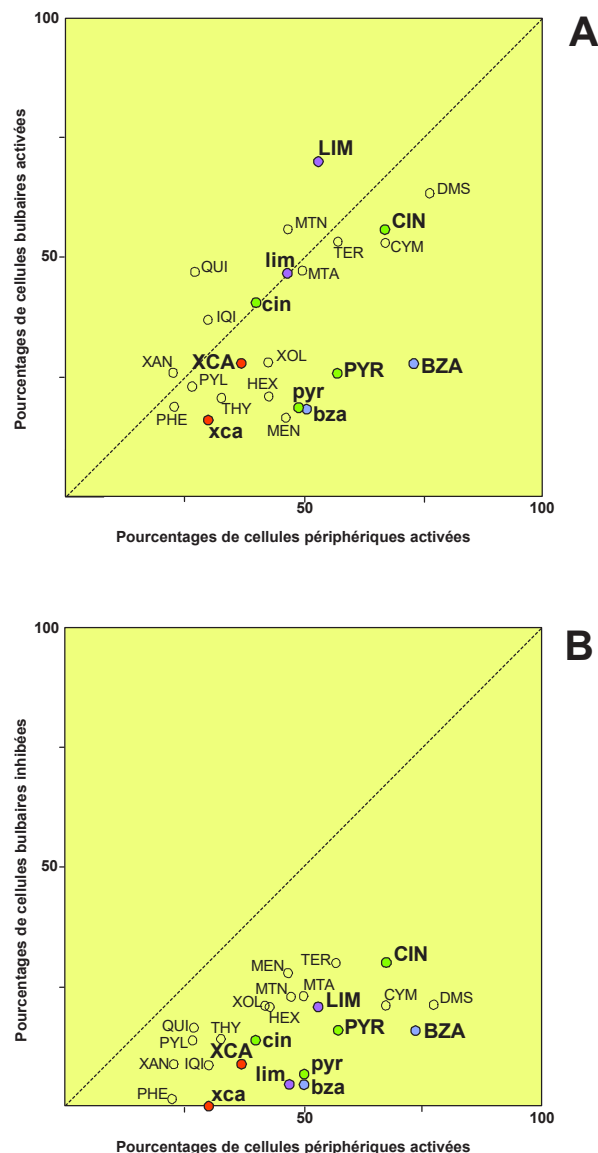


Figure 25: Corrélations entre les pourcentages de cellules activées ou inhibées à la suite des stimulations olfactives. A, activations périphériques/activations bulbaires, et B, activations périphériques/ inhibitions bulbaires. La première bissectrice est représentée par ligne en pointillés. Les points représentatifs sont, dans les deux cas, A et B, majoritairement sous la première bissectrice, ce qui illustre que la sélectivité bulbaire est plus grande que la sélectivité périphérique.

Nous retiendrons donc d'abord que le traitement bulbaire opère de façon spécifique selon les stimulus. Nous entrevoyons aussi que l'inhibition bulbaire s'étend d'autant plus que la stimulation est intense, ce qui sera confirmé, ci dessous, par l'analyse des résultats des tests de concentration.

Si on s'intéresse aux rapports entre les odorants testés aux cours de ces deux expériences menées à la périphérie et dans le bulbe olfactif, on note que l'espace des stimulus relatifs à la muqueuse olfactive selon l'analyse des correspondances n'est pas complètement restructuré après le traitement bulbaire (Fig. 26). Les représentations tridimensionnelles proposées représentent pour la muqueuse et pour le bulbe, respectivement, 39% et 40% des

variances totales. Certes, les axes factoriels ne passent pas tout à fait par les mêmes points, mais on reconnaît bien l'extraction du cinéole qui s'oppose sur l'axe 1 à la pyridine, au benzaldéhyde, et on distingue aussi la formation d'un groupe "terpénique" dans les deux espaces. On notera toutefois que le menthane et le menthène sont assez clairement extirpés du groupe "terpénique" au cours de la projection et du traitement bulbaire. La paire quinoline/isoquinoline paraît mieux dissociée après le traitement bulbaire.

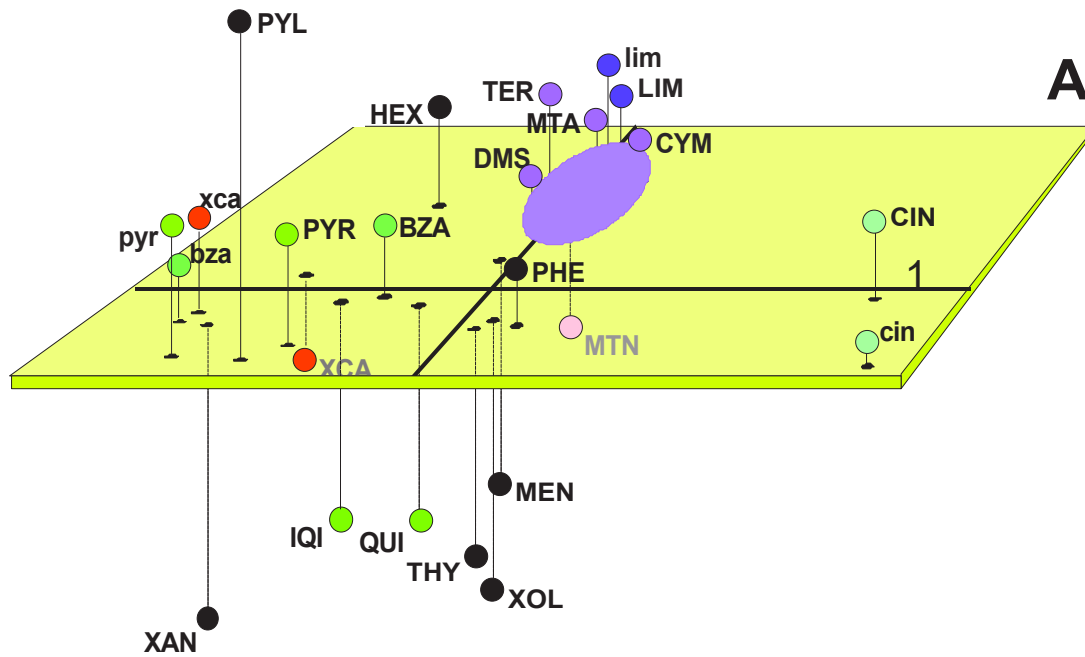
Dans ces espaces, les couples de stimulus de concentrations différentes sont particulièrement bien associés, le plus lâche étant le limonène dans l'espace défini par les cellules mitrales bulbaires (Fig. 26B).

Tableau 2: Pourcentages de recrutements de réponses cellulaires dans le bulbe (n=43) et dans la muqueuse (n=30), et leurs évolutions en fonction de la concentration du stimulus. BZA=benzaldéhyde, LIM=D-limonène, XCA=cyclohexane carboxaldéhyde, PYR= pyridine, CIN= 1,8-cinéole. En majuscules les stimulus de fortes concentrations, et en minuscules les stimulus de plus faibles concentrations. Les activations et des inhibitions bulbaires évoquées par chaque stimulus sont détaillées, ces valeurs sont cumulées pour afficher le pourcentage total des réponses bulbaires. Pour les corps testés ici, nous n'avons pas remarqué de réponses inhibitrices dans la muqueuse.

BULBE	BZA	bza	LIM	lim	XCA	xca	PYR	pyr	CIN	cin
% activations	28	19	70	47	28	16	26	19	56	40
% inhibitions	16	5	21	5	9	0	16	7	30	14
% total bulbaire	44	23	91	51	37	16	42	26	86	53
MUQUEUSE										
% activations	73	50	53	47	37	30	57	50	67	40

Pour résumer ce qui se passe en fonction des concentrations stimulantes, on constate que l'augmentation de l'intensité du stimulus conduit à une augmentation du nombre de réponses, dans la muqueuse ou le bulbe, qu'elles soient activatrices ou inhibitrices dans le bulbe (Tab. 2). Les courbes de recrutement établies par P. Duchamp ont plus tard confirmé qu'elles croissaient plus vite dans le bulbe que dans la muqueuse (Duchamp-Viret et al., 1990). Par ailleurs, en conséquence de ces recrutements, on assiste à une modification des sous-ensembles de cellules activées par un même odorant, à une transformation de l'enveloppe qui contient l'information utile. Toutefois, on constate, que les variations limitées que nous avons testées, n'aboutissent pas à une confusion des stimulus qui restent discriminés parce que subsistent des interactions avec, vraisemblablement, des lots de récepteurs significativement différents. De plus, en dépit de la variation de concentration des stimulus, on assiste à la préservation de leur appartenance à un groupe, par exemple pour le limonène, ou à un domaine de l'espace comme pour les deux concentrations du cinéole. Malgré tout, ces variations posent problème: D'une part, elles limitent la force de la notion de groupe d'odorants dans nos représentations de l'espace des odorants. Mais d'autre part, plus fondamentalement, elle nous interroge sur la relative invariance de l'odeur perçue sous des intensités différentes: Est-elle assurée? Si oui, comment est elle assurée? Y-a-t-il des mécanismes conservatoires installés dès la périphérie ou bien faut-il reporter cette opération à des niveaux supérieurs?

NEURONES RECEPTEURS



QUI, quinine, IQI, isoquinoline, MTN, menthène, MTA, para-menthane, LIM, D-limonène, TER, α -terpinène, CYM, para-cymène, DMS, diméthyl-styrène, MEN, menthol, THY, thymol, XAN, cyclohexane, XCA, cyclohexane carboxaldéhyde, XOL, cyclohexanol, HEX, hexène, CIN, 1,8-cinéole, BZA, benzaldéhyde, PHE, phénol, PYL, α -méthyl-pyrrole, PYR, pyridine.

NEURONES BULBAIRES

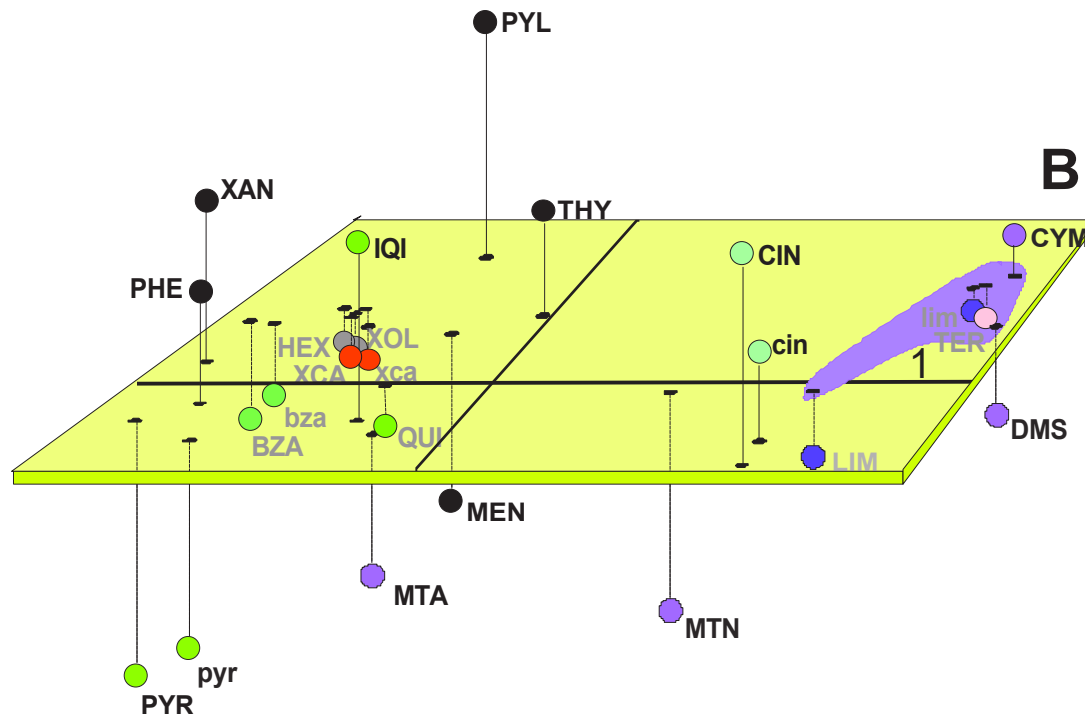


Figure 26: Espaces factoriels issus de l'analyse des correspondances des réponses de neurorécepteurs (A) ou de deutoneurones (B) du système olfactif de grenouille. Dix-neufs odorants, dont cinq à deux concentrations différentes, ont été délivrés au-dessus de la muqueuse olfactive exposée alors qu'on enregistrait les activités unitaires, soit de neurones récepteurs olfactifs, soit de deutoneurones bulbaires, au moyen de micro-électrodes. Dans chaque cas, plusieurs dizaines de profils de sélectivité constituent une matrice de réponses / non réponses soumise à l'analyse des correspondances. En rose, le groupe «terpénique» et autres colorations, les paires de concentration, sauf en vert vif, la paire quinine, isoquinoline.

1.2.2. Article 5: Duchamp, A., Sicard, G. Influence of stimulus intensity on odour discrimination by olfactory bulb neurons as compared with receptor cells. *Chem. Senses*, 1984, 8:355-366.

2. Résultats expérimentaux relatifs au modèle mammifère

2.1 Encodage périphérique

2.1.1 Réponses électrophysiologiques des neurones récepteurs olfactifs de mammifères aux stimulations odorantes

Au début des années quatre vingt, après avoir longuement étudié les neurones récepteurs olfactifs de l'amphibien, il nous apparut nécessaire de connaître, la sélectivité des neurorécepteurs olfactif du mammifère. Alors que sur le plan anatomique comme sur le plan physiologique, des différences d'organisation bulbaire entre amphibiens et mammifères étaient patentées, nous ne disposions que de très rares informations sur la physiologie des neurones récepteurs olfactifs de mammifères. En fait, la question n'avait été abordée qu'au cours d'une étude qui évaluait l'évolution de la sélectivité au cours du développement ontogénétique du rat (Gesteland et al., 1982).

Nous avons donc mis au point une préparation qui permet d'enregistrer l'activité unitaire électrophysiologique de ces neurones *in vivo*. Les souris utilisées sont âgées de plus de 3 semaines, donc adultes. Elles sont d'abord anesthésiées au pentobarbital (50 mg/kg de poids corporel). Afin d'éviter les mouvements d'air respiratoire dans la cavité nasale, suffisant pour mobiliser les électrodes d'enregistrements et donc interdire l'accès à l'activité unitaire, la trachée était sectionnée sous la gorge de l'animal et sa portion proximale était canulée, ce qui autorisait une respiration libre de l'animal. L'os du crâne était mis à nu pour être collé avec un cyanoacrylate à un support métallique rigide, cette procédure immobilisant la tête de l'animal. Le dispositif de contention comprenait une plaque chauffante maintenant la température corporelle de l'animal. Puis, la cavité nasale était ouverte par ablation successive des pans pauciers, en arrière de la truffe, et de l'os nasal, puis la création d'une boutonnière dans la paroi dorsale molle restée en place, chorion et muqueuse nasale, avec le minimum d'hémorragie. Par cette fente maintenue béante, nous avons systématiquement approché la muqueuse olfactive du septum nasal, avec des électrodes métalliques (capillaire en verre, rempli d'un alliage de métal de Wood et d'indium, indium, dépôt de noir de platine à la pointe, diamètre de la pointe 1 à 3 μm , impédance 1-4 $\text{M}\Omega$ à 1000 Hz). Une aiguille d'argent chlorurée, insérée sous la peau à l'avant de la plaie, servait d'électrode indifférente. Dans ces conditions, avec le même système d'enregistrement et le même système de stimulation, nous pouvions délivrer, entre autres, onze odorants testés antérieurement chez la grenouille alors que l'activité unitaire d'un neurone récepteur olfactif de la souris était enregistrée.

Les activités unitaires étaient recueillies dans une profondeur comprise entre 20 et 100 μm sous la surface du mucus. Les enregistrements apparaissaient souvent multiunitaires. Les potentiels de pointe recueillis ont des décours inférieurs à cinq millisecondes. Comme les neurones olfactifs d'amphibien, ceux de la souris présentent une activité spontanée plus ou moins rapide, comprise entre 3. 10^{-2} et 10 Hz. La stimulation chimique peut déclencher l'apparition de bouffées de potentiels de pointe présentant parfois une diminution d'amplitude lorsque que leur fréquence augmente, potentiels dits alors décrémentiels.

Parmi les enregistrements que nous avons réalisés, 34 neurones récepteurs ont été testés dans des conditions similaires de celles pratiquées chez la grenouille au cours d'une étude antérieure. En moyenne 7 odorants sur les onze disponibles ont été testés. Neuf cellules ont nettement répondu à un stimulus au moins: A la suite de 254 stimulations, nous avons constaté une vingtaine d'élévations transitoires de l'activité spontanée et donc identifié une vingtaine de réponses par activation, soit dans 7,9% des cas. Chez la grenouille, les mêmes stimulus, entraînaient 39% de réponses. Lorsque nous retirons de nos comptes les cellules qui n'ont répondu à aucune des odeurs testées, ce taux passe à 26,5%, alors qu'il atteignait 55%

chez la grenouille. Ces différences sont statistiquement significatives. Notre conclusion était donc que les neurones olfactifs de la souris étaient plus sélectifs que ceux de la grenouille. Toutefois, près de 50% des cellules présentaient une activité spontanée élevée, parfois irrégulière et pouvant se distribuer en bouffées, incluant parfois des potentiels de pointe décrémentiels (Fig. 27). Ces caractéristiques peuvent rendre difficile l'identification de réponses de faible amplitude.

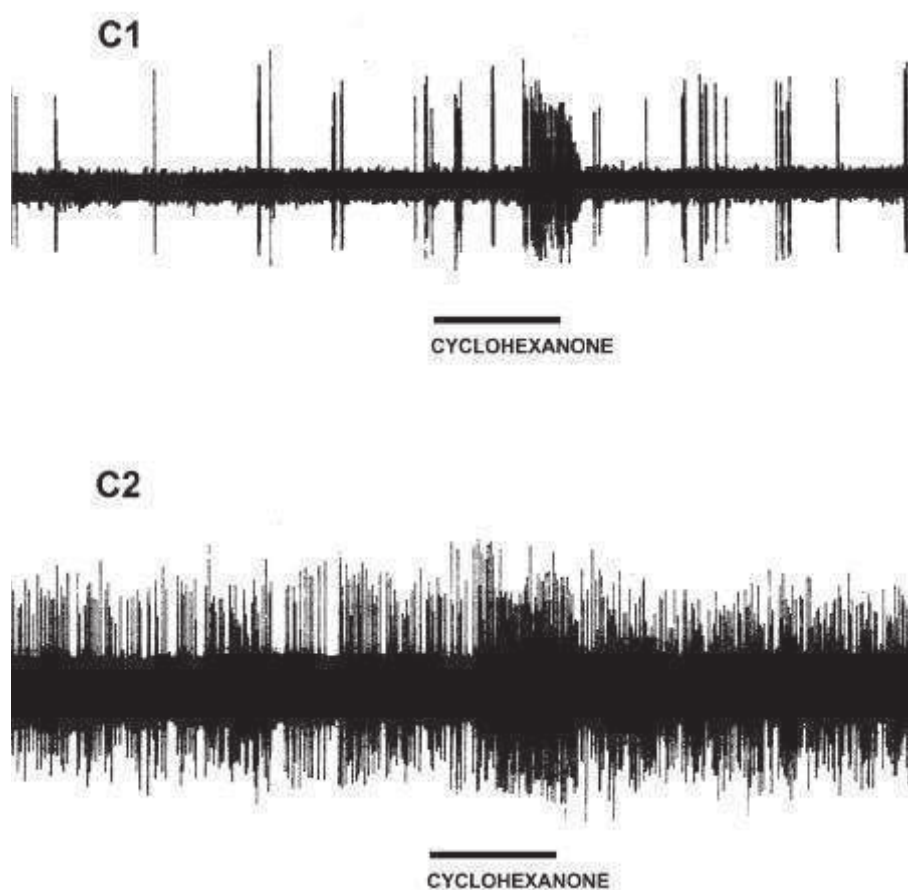


Figure 27: Exemples d'activités spontanées et de réponses aux stimulations chimiques de neurones récepteurs olfactifs de souris. Enregistrements extracellulaires en deux sites distincts, C1 et C2, de réponses à la cyclohexanone. Barre: Stimulation de 2 s.

Malgré tout, les observations que nous avons obtenues n'indiquent cependant pas que les mécanismes de réception diffèrent fondamentalement de ceux que nous avons décrits chez la grenouille. En effet, nous avons, en particulier, remarqué qu'un même neurone olfactif de souris peut répondre à des molécules aussi différentes que le camphre, la 2-heptanone, l'anisole et la cyclohexanone!

Nos données suggèrent une sélectivité plus grande des neurones récepteurs de souris comparativement à celle observée chez la même catégorie de neurones enregistrés chez la grenouille. Les comparaisons avec d'autres études posent toujours le problème des concentrations effectivement stimulantes ou de la nature des produits utilisés comme stimulus. Parce qu'utilisant une partie des produits stimulants que nous avons testés chez la souris, l'étude réalisée sur les neurones bulbaires du rat par K. Döving est la plus proche de la notre. La comparaison interspécifique d'activités nerveuses, qui plus est, à des niveaux différents du

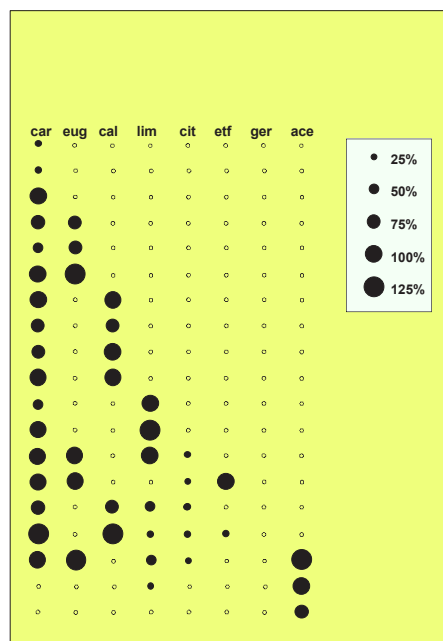


Figure 28: Exemples de profils de sensibilité de neurones olfactifs de rat. (D'après Bozza et Kauer, 1998). Après avoir isolé des neurones olfactifs de rat, les auteurs ont enregistré optiquement la réponse calcique à la stimulation odorante de certains d'entre eux. Les profils de sensibilité que montrent ces neurones récepteurs peuvent inclure différents types de molécules, d'une manière comparable à celle que nous rencontrons chez la grenouille ou la souris. Mais 75% des cellules testées ne répondent à aucun des stimulus: car: carvone, eug: eugénol, cal: cinnamaldéhyde, lim: limonène, cit: citral, etf: éthyl-fenchyl, ger: géraniol, ace: acétophénone.

système olfactif, est risquée, mais elle était jusqu'à il y a peu, une des rares que nous puissions faire pour juger de la pertinence de nos résultats recueillis chez la souris. Les règles de convergence spatiale des neurones récepteurs exprimant un même récepteur récemment établies confortent cette démarche. Lorsque K. Döving a enregistré, chez le rat, les réponses de 269 neurones bulbaires identifiés comme des cellules mitrales à une série de vingt stimulus dont onze que nous avons utilisés au cours de notre étude chez la souris (Döving, 1987). Döving a recueilli un assez faible nombre de réponses, soit 11,2% d'excitations (et 10,7% d'inhibitions), ce qui est légèrement supérieur à ce que nous avons observé à la périphérie chez la souris. Une autre étude, ayant trait au développement ontogénétique de la muqueuse olfactive du rat (Gesteland et al., 1982), indique entre E16 et E21, une forte augmentation de la sélectivité des neurones de la muqueuse olfactive vis à vis des stimulus odorants, qui aboutit à un taux de réponse nul après la naissance (sur quatre produits testés seulement il est vrai), qui semble en deçà de nos propres observations. Plus récemment, quelques enregistrements optiques de réponses calciques obtenues sur des tranches de muqueuse olfactive de souris, qu'un neurone olfactif donné, peut répondre aussi bien à des alcools qu'à des acides gras à chaînes courtes de poids moléculaires voisins mais différents (Sato et al., 1994). Plusieurs auteurs ont également rapporté que des cellules isolées de la muqueuse de rat étaient sensibles à la fois à des composés réputés recruter la voie AMPc ou la voie IP3 (Restrepo et al., 1993, Tareilus et al., 1995). Dernièrement, une élégante étude de cellules isolées après repérage de leur territoire de projection a montré que parmi les 19 cellules répondant à un mélange d'odorants, 30% des stimulations par l'un des 8 corps purs testés étaient suivies d'une réponse calcique (Bozza et Kauer, 1998) (Fig. 28).

Dans le même article, il est toutefois précisé que 75% des cellules observées dans les mêmes conditions ne répondaient à aucun des stimulus délivrés. Par ailleurs, il existe des arguments

qui plaident plutôt en faveur d'une très forte sélectivité des neurones récepteurs vis à vis des stimulus odorants. Ainsi, par exemple, la transfection d'un récepteur moléculaire, n'entraîne une variation significative de la réponse EOG que pour un stimulus sur plus de soixante testés (Zhao et al., 1997). Au cours de la même étude, les auteurs observent que des neurones récepteurs transfectés et isolés ne répondent qu'à quelques molécules de structures très voisines (heptanal, octanal, nonanal). La cohérence de ces données bibliographiques et des nôtres relatives à la sélectivité des neurones récepteurs olfactifs n'est pas claire et nous y reviendrons dans la prochaine partie de ce document.

2.1.2. Article 6: Sicard, G. Electrophysiological recordings from olfactory receptor cells in adult mice. Brain Research, 1986, 397:405-408.

2.2. Anosmie partielle: un modèle d'altération spécifique de la sensibilité olfactive

Parmi les travaux que j'ai retenus pour étayer ma thèse, on sera peut être surpris de trouver cette étude composite qui aboutit à une représentation spatiale dans la couche glomérulaire de l'activité neuronale évoquée par la stimulation odorante. En utilisant une technique de marquage anatomo-fonctionnelle, nous pouvons lire l'organisation fonctionnelle d'une portion du système olfactif avec un autre point de vue que celui apporté par les micro-électrodes. Les activités recueillies une à une à l'aide de micro-électrodes s'inscrivent dans une organisation plus large de populations neuronales qu'on peut observer, en sacrifiant les aspects temporels, à l'aide de marqueurs d'activité métabolique comme le désoxyglucose. Grâce à la découverte des récepteurs aux odeurs, et la très forte résolution des outils de marquage (hybridation in situ, gènes traceurs) qui accompagnent le développement de la biologie moléculaire, la composante spatiale a clairement été privilégiée ces dernières années. Nous envisagerons donc, sur la base de cette étude, les rapports entre les observations réalisées avec les deux approches. Par ailleurs, ce travail a aussi une résonance en terme de mécanisme de réception: En effet, une des hypothèses qui permettent d'expliquer l'anosmie partielle est qu'elle traduit directement l'expression génétique défailante d'un récepteur aux odeurs.

2.2.1. Définition de l'anosmie partielle ou spécifique: modèle humain et modèle murin

En 1948, on trouve sous la plume de Marcel Guillot une bonne description d'une altération partielle de la sensibilité olfactive qui ressemble au daltonisme, défaut de la perception visuelle plus connu, et dont les sujets atteints manifestent une incapacité à percevoir visuellement certaines couleurs seulement. Dans le cas de l'anosmie partielle, des sujets ayant par ailleurs une olfaction normale, sont incapables de percevoir l'odeur d'une substance donnée ou d'un petit groupe de substances chimiquement apparentées. Guillot lui-même en identifiait 8 types différents correspondant à certains muscs, ou à la méthyl-ionone, par exemple, et John Amoore en dénombra plus de quatre-vingt (Amoore, 1982). Elles sont assez répandues puisque, par exemple, 3% des sujets humains sont anosmiques spécifiquement à l'acide isovalérique (Amoore et al., 1968) et 50% sont spécifiquement anosmiques à l'androsténone (Amoore et al., 1977). Ces estimations ont été nuancées par une étude inter-ethnique à grande échelle, mais les ordres de grandeurs sont bien ceux-ci (Gilbert et al., 1987). Le déterminisme génétique de certaines de ces anosmies est avéré (Gross-Isseroff, et al., 1992, Griff et Reed, 1995), mais toutes ne semblent pas avoir le même statut (Wysocki et al., 1989, Lawless et al., 1995).

"Le plus simple est d'imaginer que chaque substance donnant lieu à une anosmie permanente, chez un individu, touche chez les autres un seul type de cellules sensorielles, absentes chez le sujet considéré. Ou encore, ce qui revient au même, que la cellule sensorielle spécifique étant présente, une partie du réseau nerveux qu'elle commande est interrompue (lacune ou lésion), l'ensemble du mécanisme ne pouvant fonctionner. (Guillot, 1948). L'interprétation périphérique que Guillot donne de l'anosmie partielle est effectivement plausible et privilégiée aussi par ses successeurs, moyennant toutefois l'échange de l'entité atteinte par le récepteur protéique (Amoore, 1967 Beets, 1982, Wysocki et al., 1977, Sicard et al., 1989, Lancet et Ben Arie, 1993). Elle est cependant difficile à vérifier directement chez l'Homme, puisque les outils d'exploration fonctionnelle de son organe récepteur olfactif manquent. L'étude d'un modèle animal non seulement renseignerait sur l'origine de ce déficit,

mais aussi pourrait constituer un modèle d'altération périphérique, restreinte et spécifique, de la sensibilité olfactive utile à la compréhension des mécanismes d'encodage de l'odeur et qu'on n'a pas semble-t-il réussi à créer expérimentalement (Getchell et Gesteland, 1972, Menevse et al., 1978, Delaleu et al., 1980, 1983). Wysocki et al., en 1977, comparent au moyen de tests comportementaux, la sensibilité de lignées consanguines de souris et émet l'hypothèse que les souris de la souche C57BL/6J seraient spécifiquement anosmiques à l'acide isovalérique. Compte tenu de son intérêt, nous avons étudié plus avant ce modèle murin de l'anosmie spécifique et nous livrons ci-dessous les enseignements que cette étude nous a apportés.

2.2.2. Etude de l'anosmie murine à l'acide isovalérique

En collaboration avec L. Pourtier, éthologiste, nous avons complété l'étude réalisée par Wysocki et ses collaborateurs, dont certaines conclusions nous paraissaient contestables. Au paragraphe suivant est inséré un article publié dans lequel nous avons démontré que la souris C57BL/6J était capable de détecter à distance une source odorisée par une forte concentration d'acide isovalérique: Je le résume rapidement ci-dessous.

2.2.2.1 Données comportementales originales

Une aversion alimentaire peut être déclenchée par une seule exposition au stimulus conditionnant et elle persiste durablement (Garcia et Koelling., 1977, Revusky et al., 1977, Rusiniak et al., 1979, Pamminero et al., 1980, Bermudez-Rattoni, 1987). C'est, par exemple, en associant une substance odorante à l'eau de boisson et en faisant suivre la prise de boisson d'un malaise artificiellement provoqué par une injection intra-péritonéale de chlorure de lithium, qu'il est possible de déclencher une aversion conditionnée à l'odorant ajouté à la boisson. Wysocki et ses collaborateurs ont utilisé ce paradigme expérimental pour estimer la sensibilité de différentes souches de souris vis à vis de quelques odorants. Nous avons entrepris des expériences sur la même base, en affinant les méthodes d'observations et les protocoles.

Dans une première série d'expériences, nous avons comparé les délais de contact avec une boisson unique, témoin chez des animaux assoiffés, protocole pratiqué antérieurement par Wysocki et al., 1977, mais non balancé en ce qui concerne les stimulus odorants et dont la conclusion était que les souris C57BL/6J ne détectaient pas l'acide isovalérique à distance. Ici, cette boisson pouvait être soit contrôle c'est à dire sans ajout de substance odorante, soit odorisée par l'acide isovalérique pour des animaux ayant subi un conditionnement aversif pour l'acide isovalérique et, odorisée par l'acétate d'amyle pour les animaux ayant subi un conditionnement aversif à l'acétate d'amyle. Les tests comportementaux sont passés individuellement, chaque souris ayant sa cage où l'expérimentateur ne lui présente qu'un seul biberon, puis moyenné. Les mesures des délais du premier contact avec le biberon sont répétées aux cours de quatre présentations successives de cinq minutes, régulièrement espacées sur 48H00. Les biberons sont nettoyés et stérilisés entre chaque présentation. Nous démontrons ainsi que les souris de la souche AKR/J sont capables de détecter à distance les deux odorants testés à forte concentration puisqu'elles évitent le contact avec la boisson odorisée plus longtemps que la boisson témoin. On ne peut pas conclure la même chose avec l'autre souche de souris: Dans les mêmes conditions, la réaction d'évitement n'est pas observée chez les souris C57BL/6J. Placées dans les mêmes conditions, elles boivent dans un délai aussi court tant les boissons normalement répulsives (celles contenant de l'acétate d'amyle comme celles contenant de l'acide isovalérique) que la boisson témoin. Cette différence de

comportement entre souche, non spécifique de l'odorant, n'est donc pas forcément le résultat d'une incapacité de C57BL/6J à détecter l'odeur à distance, mais peut signifier simplement que le conflit entre l'aversion pour la boisson odorisée et la soif est résolu différemment par les deux souches.

Dans la deuxième série d'expériences, on a cherché à supprimer ce dilemme. L'aversion conditionnée à l'acide isovalérique ou à l'acétate d'amyle, est suivie d'un test de choix entre deux boissons, l'une témoin et l'autre, constituée par la même solution mais odorisée par le stimulus conditionnant. Comme précédemment, les tests comportementaux sont passés et traités individuellement, chaque souris ayant sa cage et ses biberons. Ici aussi, on a mesuré des latences. Durant 11 jours successifs, nous avons enregistré les délais que les souris mettaient à contacter l'un ou l'autre des biberons. Trois dilutions différentes de chaque odorant ont été successivement testées, croissantes au cours du temps. (On a vérifié que le comportement d'évitement vis à vis de la solution la moins diluée était conservé en fin de série de tests). Les résultats montrent que, selon cette variable, la réaction d'évitement est d'autant plus importante que la concentration des produits odorants est élevée, quel que soit le stimulus test, chez les deux souches. On ne distingue donc pas les deux souches selon ce critère. On remarque toutefois que pendant la période d'observation, certaines souris évitent totalement la pipette odorisée, donc n'ont aucun contact direct avec la source d'odeur: L'évitement (ou corrolairement le choix de la boisson) se fait alors probablement grâce à une information prise à distance, hypothétiquement olfactive. Si on analyse les distributions des fréquences des prises d'information par contacts directs, on différencie bien les deux souches (Fig. 29): Les deux souches tendent à se comporter identiquement vis à vis de l'acétate d'amyle. Par contre avec l'acide isovalérique, on note que les souris C57BL/6J ont d'autant plus de contacts avec les biberons odorisés que les solutions sont plus diluées, n'évitant clairement la solution odorisée qu'à sa plus faible dilution (10^{-3}). Au contraire, sans ambiguïté, les souris AKR évitent les contacts directs avec la solution d'acide isovalérique à toutes les dilutions proposées. On peut effectivement interpréter ces contacts inattendus des souris de la souche C57BL/6J avec des boissons qui devraient être répulsives (qui le sont pour les souris de AKR/J), comme le signe la sensibilité moins grande de cette souche vis à vis du signal aéroporté, l'acide isovalérique.

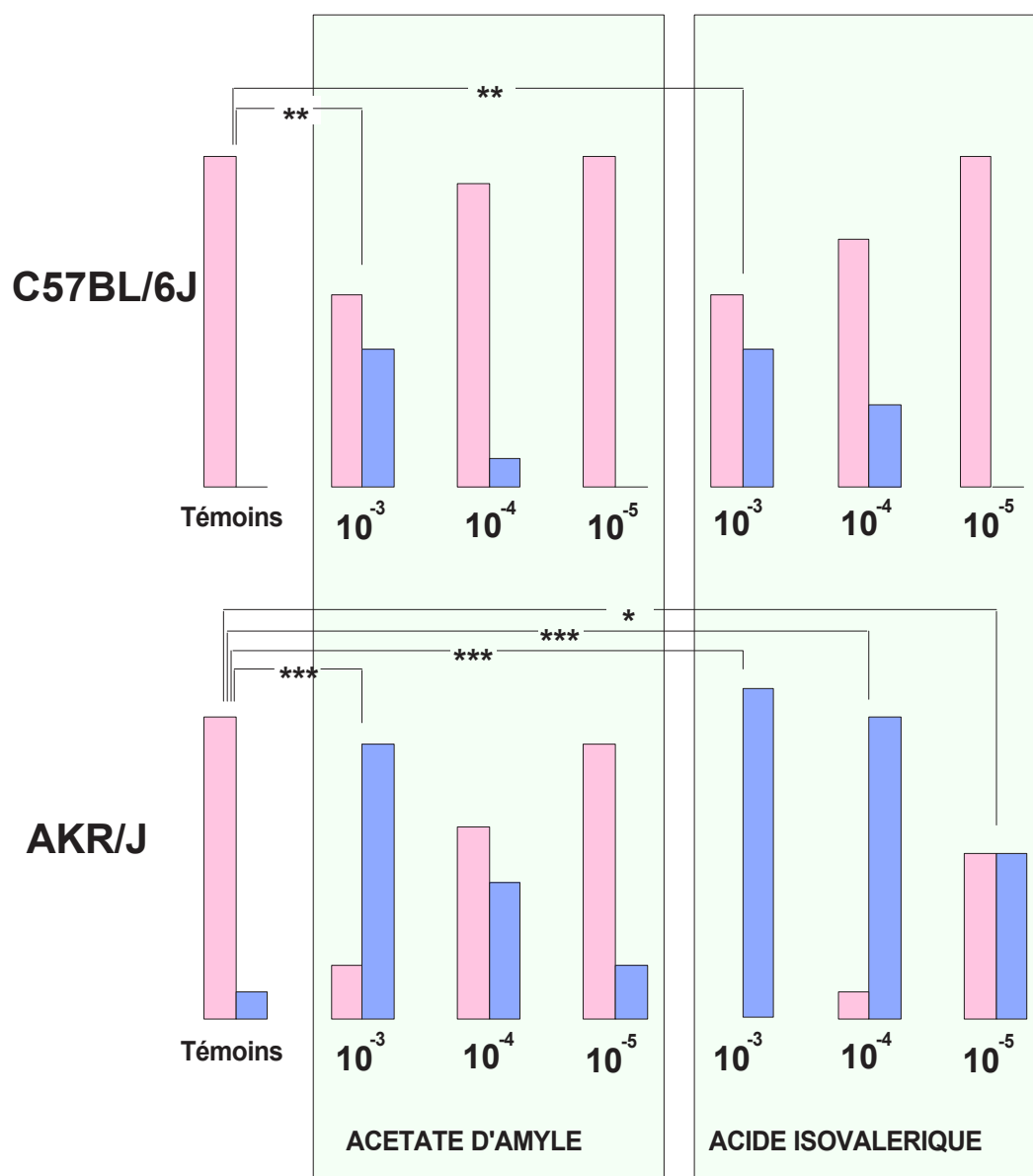


Figure 29: Détection à distance de sources odorisées aversives chez les souris AKR/J et C57BL/6J. Nous avons comparé les effets des dilutions, 10^{-3} , 10^{-4} et 10^{-5} (vol/vol) de signaux olfactifs, acétate d'amyle ou acide isovalérique, dans une eau de boisson sur le comportement d'évitement. Nous avons comptabilisé les individus ayant eu un contact direct avec la pipette odorisée (en jaune) ou l'ayant évité (en violet) pendant un test de choix entre une boisson témoin et une boisson contenant une substance rendue répulsive par un conditionnement alimentaire aversif. Les différences significatives de distributions entre la situation témoin et les situations tests sont indiquées (test de Fisher, $p < 1\%$: ***, $p < 2\%$: **, $p < 5\%$: *).

2.2.2.2. Article 7: Pourtier, L. et Sicard, G. Comparison of the sensitivity of C57BL/6J and AKR/J mice to airborne molecules of isovaleric acid and amyl acetate. Behavior and Genetics, 1990, 20:499-509.

2.2.2.3. Données électrophysiologiques originales

Si un déficit de sensibilité olfactive est constaté, il est possible que son origine soit périphérique, c'est à dire que les neurones récepteurs eux-mêmes ne puissent pas assurer la détection du stimulus. Dans ce cas, il devrait être possible d'objectiver cette défaillance par comparaison des réponses électrophysiologiques de la muqueuse olfactive entre animaux affectés du déficit et des animaux témoins. C'est ce que nous avons fait pour estimer la sensibilité périphérique à l'acide isovalérique de la souche de souris C57BL/6J et que nous rapportons ici.

L'amplitude de la réponse EOG, signal intégrant l'activation par la stimulation chimique de plusieurs centaines de cellules réceptrices est un estimateur de la sensibilité de la population à un stimulus donné. Nous savons cependant que l'amplitude de la réponse à un stimulus donné est variable d'un point d'enregistrement à un autre (Daval et al., 1970; Mackay-Sim et al., 1982; Edwards et al., 1988; Ezeh et al., 1995). La comparaison directe des amplitudes des réponses à un odorant donné est ainsi risquée puisque d'un animal à l'autre, il est difficile d'assurer que les sites d'enregistrement sont identiques. Nous avons utilisé un protocole qui contourne cette difficulté. L'amplitude d'un stimulus témoin ne dépend que du site d'enregistrement, nous avons donc formé les rapports:

$$\frac{\text{amplitude de la réponse à l'acide isovalérique}}{\text{amplitude de la réponse à l'acétate d'amyle}}$$

pour comparer la sensibilité à l'acide isovalérique des deux souches, C57BL/6J réputée anosmique à l'acide isovalérique et AKR, normosmique.

Méthode. Douze souris C57BL/6J et six AKR ont été utilisées au cours de cette étude. La tête des animaux est isolée après anesthésie des animaux au moyen d'équithésine (XXX/kg de poids corporel). La paroi muqueuse latérale de la cavité nasale droite a été exposée par résections de la cavité nasale gauche puis du septum nasal.

Le protocole de stimulation consista à délivrer des odorants à 1 cm des cornets olfactifs à l'aide d'un stimulateur à échelle de dilutions. Les stimulations duraient 2 secondes et étaient délivrées dans un flux gazeux de 200 ml/min.

L'enregistrement de l'activité électrophysiologique à la surface de la muqueuse olfactive a été réalisé au moyen d'électrodes de polyéthylène, dont le diamètre à la pointe était de 0,5 mm, remplie d'un gel d'agar-agar, 6 g / 100 ml d'une solution aqueuse saline à 0,9% de NaCl. L'électrode de mesure était reliée à un amplificateur conventionnel en courant continu avec un gain de 1000. L'électrode indifférente était constituée d'une aiguille d'argent chlorurée fichée dans la peau du museau. Les enregistrements ont été stockés grâce à un enregistreur sur papier (Gould ES100) et les amplitudes d'EOG ont été mesurées directement sur ces tracés. Sur chaque préparation, plusieurs points répartis sur les faces médianes des différents cornets ont été testés.

Certains essais ont été éliminés du lot analysé, à la suite soit de la dégradation très rapide de la réactivité de la muqueuse olfactive, soit du fait de l'irrégularité des séries de dilutions que nous avons pu tester.

Résultats. Nous avons enregistré, en plusieurs points chez les animaux de chaque souche, des EOG à l'acétate d'amyle et à l'acide isovalérique, stimulus proposés à plusieurs dilutions,

des vapeurs saturantes. La figure 30, ci après, montre des exemples de réponses EOG enregistrées chez les deux souches de souris. Au total, 44 enregistrements ont permis d'observer des réponses EOG pour l'un ou l'autre des stimulus délivrés, y compris chez les souris C57BL/6J stimulées par l'acide isovalérique.

Les moyennes des amplitudes recueillies pour chaque souche et chaque stimulus sont listées ci-dessous.

Afin de traiter statistiquement la comparaison des rapports d'amplitudes, nous avons retenu les séries d'enregistrements où chaque point avait été testé avec les 2 stimuli avec l'un ou l'autre des rapports de dilutions. La comparaison au moyen d'un test t des rapports d'amplitudes obtenus chez les souris C57BL/6J et les souris AKR montre que ces rapports, 0,179, n=15, et 0,531, n=6, respectivement, sont significativement plus faibles ($t=-2,169$, $p<5\%$) chez les souris C57BL/6J pour les stimulations les plus intenses (dilutions de 10^{-2}). La différence, 0,226, n=15, versus 0,340, n=5 n'atteint pas le seuil de significativité ($t=-1.435$, $p>5\%$) pour les intensités stimulantes basses (dilutions de 10^{-6}).

souche	AKR				C57			
odeur	IVA		AA		IVA		AA	
facteur de dilution	10^{-2}	10^{-6}	10^{-2}	10^{-6}	10^{-2}	10^{-6}	10^{-2}	10^{-6}
EOG moyen (mV)	1,5±0,8	0,7±0,4	3,3±2,0	1,4±1,2	0,5±0,4	0,2±0,2	2,4±1,4	1,1±0,8
effectif	8	9	7	8	20	16	26	26

Tableau 3: Moyennes des amplitudes des électro-olfactogrammes obtenus en réponse à l'acétate d'amyle ou l'acide isovalérique chez des souris de la souche AKR/J (AKR) ou C57BL/6J (C57). Les facteurs de dilution indiqués sont comptés par rapport à la vapeur saturante. AA = acétate d'amyle, IVA = acide isovalérique.

Discussion. Nous avons montré qu'indéniablement certains neurones récepteurs olfactifs des souris de la souche de souris C57BL/6J, réputées anosmiques à l'acide isovalérique sont bien sensibles à cette substance. Cependant, les réponses EOG apparaissent au moins deux fois plus faibles que chez AKR. Nous rappelons ici, que notre examen détaillé des réponses individuelles comportementales laisse penser que toutes les souris C57BL/6J n'ont pas le même degré d'hyposmie. De fait, la modification de sensibilité à l'acide isovalérique des souris C57BL/6J sous l'influence de facteurs environnementaux a été démontrée à la fois sur le plan comportemental et le plan électrophysiologique (Wang et al., 1993). La variabilité observée pourrait être due aux conditions d'élevage que nous n'avons pas totalement contrôlées. Quoiqu'il en soit, la différence de sensibilité électrophysiologique que nous objectivons ici est cohérente avec l'hypothèse d'une hyposmie génétique pour l'acide isovalérique chez les souris de la souche C57BL/6J, d'origine périphérique. On pourrait l'interpréter comme un défaut de régulation de l'expression de récepteurs spécifiques pour l'acide isovalérique, ou bien, au-delà, d'une variation de réactivité des mécanismes de transduction associés à la reconnaissance de l'acide isovalérique, sans atteinte du récepteur lui-même.

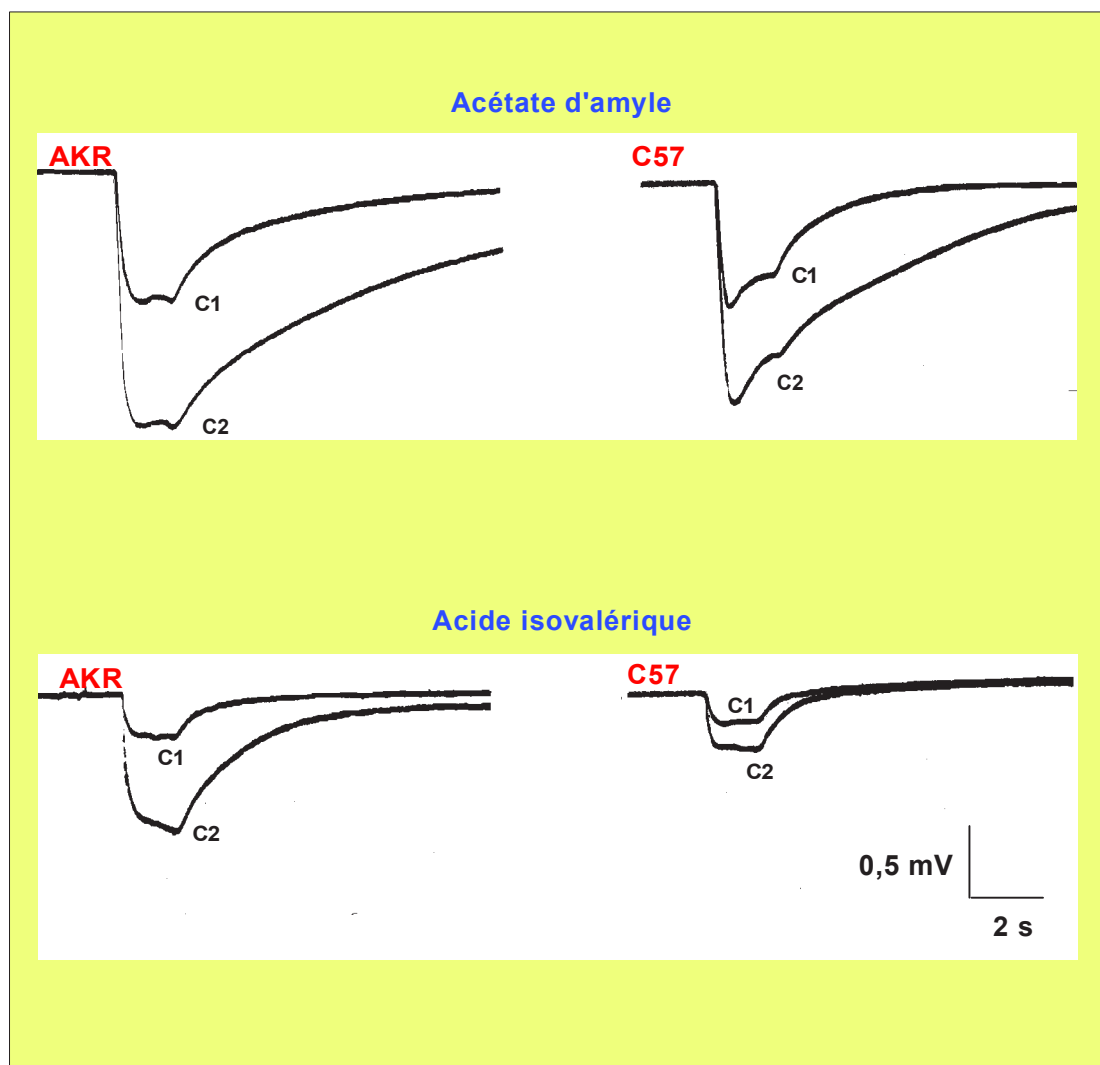


Figure 30: Déficit périphérique chez les souris C57B/6J spécifiquement hyposmiques à l'acide isovalérique. Les souris C57BL/6J montrent comportementalement un déficit sélectif de sensibilité vis à vis de l'acide isovalérique et comparativement aux animaux de la souche AKR/J. Ici, les réponses à deux concentrations C1 et C2 d'acide isovalérique et de l'odeur témoin, l'acétate d'amyle, ont été enregistrées au même point soit chez un animal de la souche C57, soit chez un animal AKR. Les réponses électriques de muqueuses olfactives de la souche C57 à l'acide isovalérique sont de moins grandes amplitudes que celles qu'on enregistre chez la souche témoin. On peut mettre en évidence cette altération spécifique en calculant et en comparant entre les deux souches, les rapports d'amplitudes des réponses à l'acide isovalérique aux amplitudes des réponses à l'acétate d'amyle enregistrées aux mêmes points.

2.3. Encodage bulbaire

2.3.1 Anosmie partielle et activation bulbaire: Données anatomo-fonctionnelles

Les neurones ne possèdent pas de stock de glucose, pourtant source d'énergie indispensable, et captent nécessairement cette molécule extemporanément lorsqu'ils sont activés. Le désoxyglucose entre comme le glucose dans les cellules actives mais n'est pas dégradé par le cycle de Kebbs et s'accumule dans les cellules qui l'ont capté. On peut repérer dans le tissu ces accumulations grâce à l'insertion d'un atome radioactif dans la molécule. Injecté dans la circulation générale, le désoxyglucose se distribue vite dans l'ensemble de l'espace extracellulaire et peut s'accumuler dans les neurones, d'autant plus qu'ils sont actifs (Kennedy et al, 1975, Sokoloff et al., 1977). Après une exposition à un stimulus répété, on sacrifie des animaux, on récupère rapidement les structures concernées qu'on congèle, puis on réalise au cryostat des coupes sériées des structures nerveuses à observer et on expose les coupes histologiques de tissu sur du papier photosensible. On obtient des autoradiogrammes superposables aux coupes histologiques, qui seront localement d'autant plus impressionnés que le marqueur radioactif est concentré: On établit ainsi des cartes d'activation neuronale.

Une série de travaux sur l'activité des bulbes olfactifs d'animaux soumis à des stimulations olfactives, montrent, en particulier, que ce marqueur d'activité métabolique s'accumule dans certains glomérules olfactifs (Skeen, 1977, Stewart et al., 1979, Jourdan et al., 1980, Astic et Saucier, 1982, Astic et Cattarelli, 1982, Jourdan, 1982, Lancet et al., 1982). La distribution de l'activation glomérulaire est caractéristique de l'odeur. Le premier article ci-après, méthodologique, explique comment nous avons amélioré les procédures de mesure, (méthode semi-quantitative), de reconstruction des cartes d'activation et mis au point une stratégie d'analyse pour comparer entre elles les cartes d'activation glomérulaires bulbaires de plusieurs individus (Fig. 31).

Brièvement, les autoradiogrammes sont numérisés, après diverses corrections optiques et transformation en images en niveaux de gris. L'intervalle d'échantillonnage qui veut éviter de visualiser deux fois un même glomérule conduit à ne retenir qu'une douzaine de coupes par bulbe. Sur l'écran d'un ordinateur, la superposition des images numérisées de la coupe et de l'autoradiogramme correspondant permet de délimiter la couche glomérulaire au crayon optique. On mesure ensuite la densité optique moyenne dans les intersections successives et moyennes d'une fenêtre mobile de lecture et de la zone glomérulaire délimitée. Le pôle dorsal de la couche glomérulaire est repéré. Pour rendre comparables différents individus, nous avons choisi la normalisation des mesures par rapport la distribution des densités optiques de chaque bulbe. Le vecteur représentatif de la couche glomérulaire, véritable profil d'activation, sert ensuite à reconstruire les cartes d'activation planes. On moyenne cinq éléments successifs du vecteur correspondant à chaque coupe, on transforme les valeurs de densité optique en surfaces de tailles proportionnelles aux densités optique moyennes. On aligne d'avant en arrière soigneusement les pôles dorsaux repérés et on développe de part et d'autre de l'axe ainsi constitué les éléments de chaque vecteur correspondant aux coupes successives échantillonnant le bulbe olfactif. On a aussi la possibilité de comparer les vecteurs représentatifs des activations glomérulaires, en utilisant des analyses multivariées. Cette comparaison statistique des cartes d'activation est réalisée, en changeant le format des vecteurs pour les rendre strictement superposables (suppressions ou extrapolations des données manquantes). Chaque carte d'activation est alors représentée par un vecteur de 156 variables. Une analyse en composantes principales permet à la fois de représenter les proximités entre les cartes et, par l'analyse des corrélations des éléments des vecteurs avec les axes factoriels, de détecter les

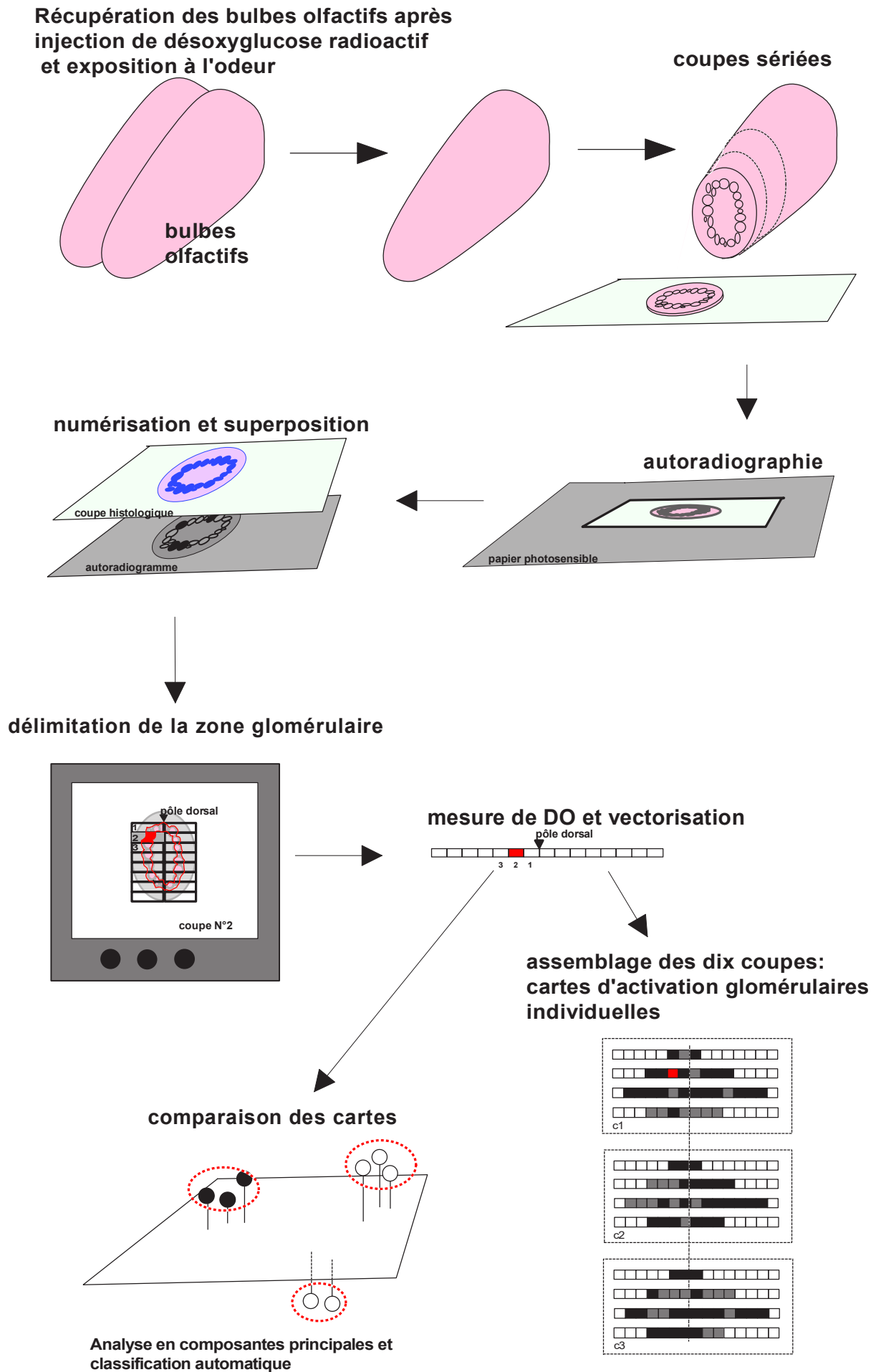


Figure 31: Stratégie d'analyse et comparaison des autoradiogrammes de bulbe olfactif de souris appartenant à deux souches stimulées par n substances odorantes différentes. Explications dans le texte.

zones les plus typiques des profils d'activation. On représente les projections selon les trois premiers facteurs qu'on complète par une classification automatique qui a l'avantage de retenir toute la variance contenue dans les tableaux de données.

Cette procédure a été appliquée à la comparaison des profils d'activation glomérulaires d'animaux appartenant à deux souches de souris, AKR/J et C57BL/6J. Chaque animal a été soumis à un protocole de stimulation soit par l'acide isovalérique soit par l'acétate d'amyle, délivré à deux concentrations. Les animaux ont reçu une injection intrapéritonéale de ^{14}C -désoxyglucose ($200\mu\text{Ci/kg}$) puis sont placés dans une cage parcourue de haut en bas par un flux d'air laminaire à 25°C , balayant les odeurs intempestives qui pourraient s'accumuler dans la cage. L'air était alternativement odorisé et désodorisé par période de 5 minutes durant les 45 minutes que durait la phase d'exposition aux stimulus. Après sacrifice des animaux, les bulbes olfactifs sont ensuite très rapidement prélevés et congelés à -50°C . Ils sont coupés au cryostat, l'épaisseur des coupes étant de $20\mu\text{m}$. Les coupes sont placées en contact direct avec un film radio-sensible (Kodac, DEF5), à 4°C , pendant 7 jours. Puis, les coupes sont colorées au violet de crésyl et les autoradiogrammes développés et fixés. La procédure d'analyse précédemment décrite est lancée. La résolution de l'ensemble d'acquisition est telle que chaque pixel des images digitalisées correspond à un carré de $6\mu\text{m}$ de côté. Treize coupes ont été analysées par animal. La hauteur de la fenêtre de lecture déplacée sur la couche glomérulaire pour réaliser les mesures de densité optique était de $120\mu\text{m}$. Chaque coupe est donc représentée par un vecteur de valeurs de densités optiques. Les cartes sont reconstruites en alignant les pôles dorsaux et un profil de 77 valeurs calculées pour comparer les cartes au moyen de l'analyse en composantes principales et d'un algorithme de classification hiérarchique ascendante.

Chez les deux souches, nous constatons que des zones glomérulaires sont clairement marquées à la suite des stimulations soit par l'acétate d'amyle soit par l'acide isovalérique. La variation des cartes est grande, mais le motif de marquage est clairement spécifique du stimulus. Les animaux témoins présentent aussi des marquages glomérulaires non négligeables, mais leur distribution n'est pas reproductible.

Pour l'acide isovalérique, on remarque deux zones de fort marquage, l'une, très reproductible, est bien circonscrite à une dizaine de glomérules dans la couche glomérulaire médio-dorsale, environ au tiers antérieur du bulbe et l'autre, plus antérieure et plus diffuse, sur la face latérale du bulbe. On note toutefois que le marquage médio-dorsal typique est plus diffus ou moins intense chez AKR/J. Pour l'acétate d'amyle, le marquage est plus largement réparti, dans les territoires postéro-ventral de la face médiane et de la face latérale.

La comparaison statistique (Fig. 32) montre que les motifs d'activation permettent effectivement de regrouper les animaux en:

- un groupe comportant les quatre souris C57BL/6J et un animal de la souche AKR/J stimulés par l'acide isovalérique,
- distinct d'un groupe de trois animaux de la souche AKR/J stimulés par l'acide isovalérique,
- et d'un groupe comprenant les animaux des deux souches stimulés par l'acétate d'amyle.

Autrement dit, les deux souches diffèrent surtout par les motifs d'activation glomérulaires évoqués par l'acide isovalérique.

L'effet de la baisse de concentration peut se résumer à une réduction de l'extension du marquage, et à une dispersion moins grande des profils d'activation (Stewart et al., 1979).

Ainsi, nous confirmons par cette étude anatomo-fonctionnelle d'une part que les motifs d'activation glomérulaire sont assez reproductibles d'un animal à l'autre. Nous avons pu vérifier également que le marquage dorso-médian évoqué par l'acide isovalérique était présent dans une zone homologue chez le rat (Fig. 33). D'ailleurs, les données d'anatomie

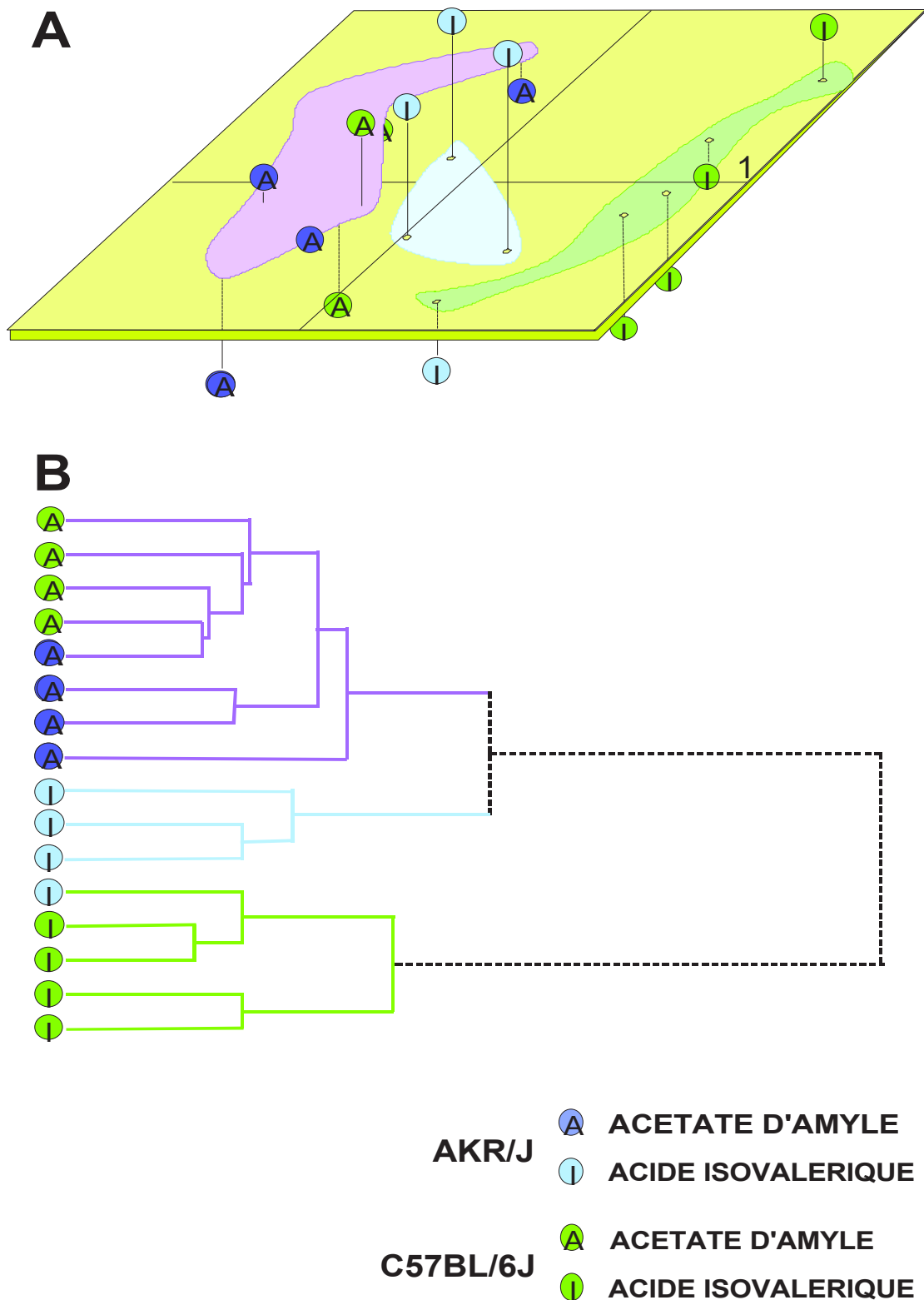


Figure 32: Comparaison des motifs d'activation glomérulaires évoqués par l'acide isovalérique ou l'acétate d'amyle chez les souches de souris C57BL/6J et AKR/J. A- Espace factoriel. B- Classes taxinomiques. Les points représentatifs des profils d'activation glomérulaires correspondant à AKR/J sont dans les tons bleutés, ceux correspondant à C57BL/6J sont verts. Stimulus : A = acétate d'amyle, I = acide isovalérique. Les subdivisions taxinomiques au niveau 3 distinguent clairement trois groupes de cartes d'activation. Les résultats de l'analyse taxinomique sont reportés à l'aide des couleurs dans l'espace factoriel A. Notre analyse discrimine parfaitement les souches selon les motifs d'activation évoqués par l'acide isovalérique. La distinction est bien moins nette pour ce qui concerne les motifs évoqués par l'acétate d'amyle. Ainsi, au déficit périphérique spécifique de la souche C57BL/6J correspond bien une variation de la distribution glomérulaire de l'activation.

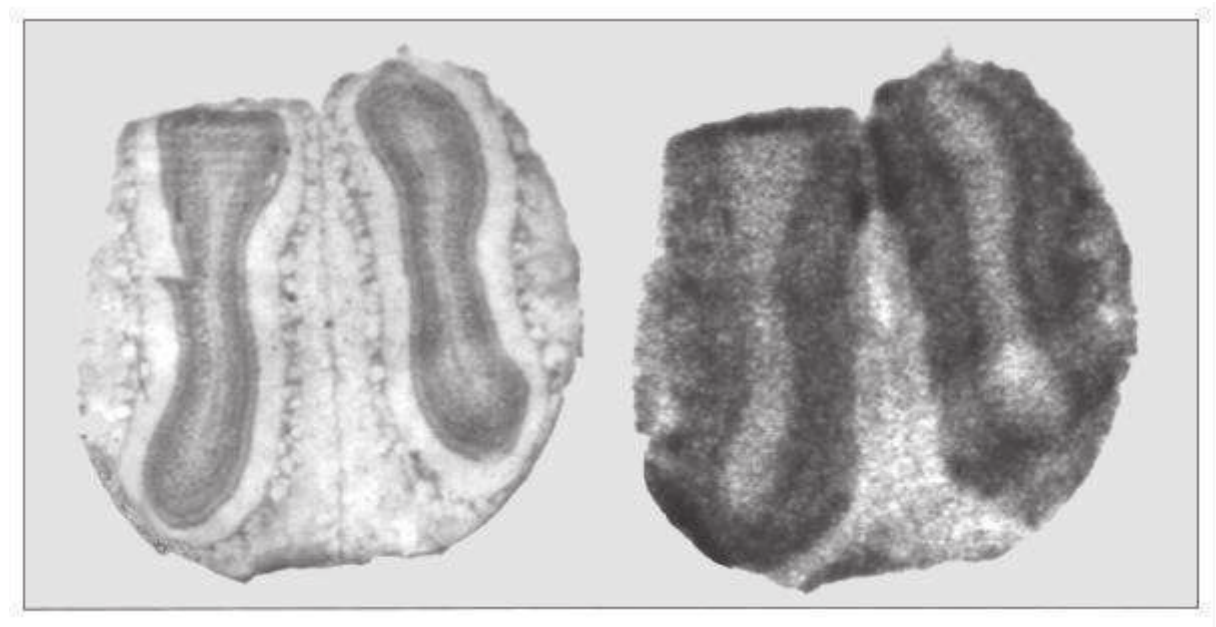


Figure 33: Exemples d'une coupe transversale de bulbes olfactifs de rat et de l'autoradiogramme correspondant. L'animal ayant subi une injection de 2 $\mu\text{Ci/kg}$ de 2désoxy-glucose radioactif (^{14}C) a été exposé à l'acide isovalérique selon un protocole de stimulations de 5 minutes alternées avec des phases de repos pendant 45 minutes. Après sacrifice de l'animal, les bulbes sont coupés au cryostat et les coupes sont exposées sur un papier radio-sensibles pour une semaine à 4 °C. A gauche, la coupe histologique après coloration au violet de crésyl, prélevée environ au tiers antérieur des bulbes, à droite l'autoradiogramme correspondant. On remarquera un foyer de marquage dans la couche glomérulaire, en position médiane et dorsale. Sicard et Jourdan, donnée originale.

fonctionnelles ou d'électrophysiologie disponibles dans la littérature confirment que les acides gras à chaînes courtes évoquent une activité fortement focalisée dans la même zone médio-dorsale (Mori et al., 1990, 1992; Bell, 1984; Bozza et Kauer, 1998). Le déficit spécifique à l'acide isovalérique s'étend, chez l'homme à d'autres acides gras à chaînes courtes de poids moléculaires voisins (Amoore et al., 1972). On conçoit assez bien que les récepteurs aux odeurs puissent avoir une spécificité suffisamment large pour les confondre, et donc qu'une carence de l'un d'eux puisse être responsable du déficit.

Mais les données récentes de la biologie moléculaire, nous apprennent que cette carence n'affecte pas seulement la sensibilité des récepteurs: Elles ont un retentissement sur l'organisation des projections bulbaires (Wang et al. 1998), et on peut penser que des variations dans les projections épithélio-bulbaires, voire dans les relations entre certaines zones glomérulaires puissent gravement modifier les représentations nerveuses des odorants. A cet égard, nous rappelons que nous avons noté des différences saillantes de distributions d'activations glomérulaires évoquées par l'acide isovalérique chez les deux souches comparées ici.

2.3.2 Article 8: Royet, J.P., Sicard, G., Souchier, C. and Jourdan, F. Specificity of spatial patterns of glomerular activation in the mouse olfactory bulb: computer-assisted image analysis of 2-DG autoradiograms. Brain Res., 1987, 417, 1-11.

2.3.3. Article 9: Sicard, G., Royet, J.P. and Jourdan, F. A comparative study of 2-deoxyglucose patterns of glomerular activation in the olfactory bulbs of C57 BL/6J and AKR/J mice. Brain Res., 1989, 481: 325-334.

3. Conclusion de la deuxième partie

A la suite de ce travail sur l'anosmie spécifique murine à l'acide isovalérique, nous concluons donc que le déficit observé chez C57BL/6J comparativement à AKR est plus une hyposmie sélective qu'une réelle anosmie spécifique. Il s'agit d'un résultat statistique. Il est clair que le système olfactif des souris C57BL/6J peut répondre à la stimulation par l'acide isovalérique. Les données comportementales sont toutefois cohérentes avec l'idée que cette sensibilité ait un seuil plus élevé chez C57BL/6J que chez AKR/J. De plus, les données fonctionnelles électrophysiologiques démontrent une altération périphérique de la sensibilité à cet odorant chez C57BL/6J comparativement à AKR/J. Toutefois, à cause de la dispersion des résultats comportementaux ou fonctionnels, nous nous sommes demandés si cette caractéristique de la souche C57BL/6J, est également partagée par tous les individus de cette souche. Les observations comportementales sont cohérentes avec l'idée que cela ne serait pas les cas. La démonstration selon laquelle, dans les cas d'anosmies spécifiques, la sensibilité, comportementalement ou électrophysiologiquement mesurée, est susceptible de varier selon l'environnement olfactif des animaux (Wang et al., 1993), constat aussi valable pour le sujet humain (Wysocki et al., 1989, Lawless et al., 1995), conforte l'idée que l'explication par une carence de l'expression d'un récepteur moléculaire d'origine génétique pourrait s'avérer simpliste. Les variations de sensibilité peuvent résulter de la variation du nombre de récepteurs disponibles pour le stimulus, mais aussi de l'amélioration du mécanisme de transduction par, par exemple, l'entretien de l'état du complexe récepteur - protéine G (Dohlman et Thorner, 1997). L'efficacité de ce réglage peut bien dépendre lui-aussi d'un contrôle génétique.

Compte tenu des profils de sélectivité des neurones récepteurs assez larges que nous avons rencontrés chez la souris ou la grenouille, l'existence d'anosmies spécifiques, est difficile à expliquer. En effet, tout nous porterait à croire qu'un odorant donné est reconnu par de multiples récepteurs. Ceux-ci, probablement se projettent dans de nombreux territoires bulbaires. D'ailleurs, les expériences de lésions bulbaires partielles démontrent que des rats, localement ou largement lésés continuent à accomplir les tâches impliquant la reconnaissance d'odorants (Slotnick et al., 1997, Lu et Slotnick, 1998). Cette remarque peut justifier à elle seule notre propension à parler d'hyposmies spécifiques plutôt que d'anosmies spécifiques. Lorsque les stimulus sont présents à des concentrations voisines du seuil normal, on peut considérer qu'ils ne recrutent que des récepteurs de forte affinité. A ces intensités faibles, leur défaut prend un relief particulier. Dans des cas exceptionnels, lorsque les molécules odorantes ont intrinsèquement peu de possibilités d'interaction, c'est à dire qu'elles sont rigides, qu'elles ont une faible pression de vapeur (et souvent un fort poids moléculaire) ou qu'elles ont un coefficient de partage eau/lipides trop défavorable, et qu'elles présentent un intérêt biologique particulier, nous imaginons qu'il existe un récepteur extrêmement adapté (à haute affinité) pour assurer leur détection. Le défaut d'un récepteur dédié ne serait alors pas compensé par d'autres possibilités d'interactions.

TROISIEME PARTIE: DISCUSSION

En partie, au fur et à mesure que nous exposons nos résultats, nous avons déjà critiqué et commenté nos travaux. Reste dans cette dernière partie à les relier et à en tirer quelques conséquences à la lueur de données plus récentes, ou bien, symétriquement si l'on peut dire, à examiner comment ils nous aident à mieux comprendre ces nouvelles découvertes elles-mêmes. Enfin, nous tenterons d'apporter quelques éléments qui relient les messages olfactifs à la perception de l'odeur.

1. Un espace neural pour encoder l'odeur

Le système nerveux est effectivement un espace constitué de réseaux de neurones qui, à plusieurs niveaux d'organisation ou plusieurs échelles, admet une description en termes topographiques. Nous entendons par là, que l'information qu'il traite, se dirige vers ou occupe des portions *reconnaissables* de l'espace en trois dimensions que lui offre le système nerveux.

La subdivision du cerveau a d'abord été réalisée selon le critère descriptif anatomique. L'altération d'une capacité de l'organisme après la lésion d'une structure anatomique permet d'en reconnaître la fonction. L'anatomie fonctionnelle sur cette base s'est de plus en plus raffinée. La pertinence des travaux primordiaux de Gall ou de Broca illustre bien cette vision topographique de l'organisation du cerveau, avec d'ailleurs un abandon de la référence à la distinction purement anatomique. On trouve cette approche jusque dans la récente neurochimie qui illustre bien la possibilité de cartographier sur la base de neuromédiateurs et de superposer des fonctions aux subdivisions qu'on identifie alors. L'anatomie fonctionnelle qui exerce son talent avec des outils adaptés, munie de marqueurs des protéines ou des acides nucléiques, remporte et continuera de remporter des victoires neurophysiologiques. Il est cependant un lieu où ce mode de description ne peut plus suffire. Il nous est difficile de croire que la complexité remarquable des liens synaptiques entre les cellules du réseau neuronal se résume à un partage de territoires nerveux. Par ailleurs, personne ne semble nier que l'information circule dans le réseau, ce qui offre une autre dimension, temporelle, à l'analyse physiologique du fonctionnement nerveux. Bref, des mécanismes fondamentaux du traitement de l'information nerveuse s'inscrivent bien dans un support topographiquement organisé, mais ils ont leurs propres lois qui, elles, peuvent échapper à une description en termes anatomo-fonctionnels.

Sans ambiguïté donc le système sensoriel olfactif s'inscrit dans un espace neural et utilise cet espace comme un support pour "représenter" les stimulus auxquels il est sensible (Shepherd, 1985). Les données les plus récentes sont frappantes de ce point de vue puisqu'elles dessinent des principes d'organisation spatiaux qui pourraient bien coïncider avec une représentation spatiale de l'information olfactive.

Notre travail, non seulement du fait de l'environnement scientifique dans lequel nous l'exposons, mais aussi parce que nous avons utilisé des micro-électrodes et un marqueur d'activité métabolique, se situe dans ce lieu, parfois inconfortable, où il faut conjuguer plusieurs approches. Il nous faut concilier des informations électro-physiologiques unitaires obtenues d'un échantillon limité de neurones et celle qui d'emblée, offre une représentation spatiale

macroscopique de la distribution de l'activation nerveuse évoquée par le stimulus olfactif. Une confrontation d'outils et d'échelles différentes qui nous fait penser à celle proposée par Prigogine et Stengers imaginant La Nouvelle Alliance.

Quoiqu'il en soit, la discussion que nous entamons ci-dessous a pour enjeu, une meilleure appréciation de ce qui représente le stimulus chimique dans le système olfactif périphérique. On parle facilement de code ou d'encodage de l'odeur, et nous cherchons à donner un contenu plus précis à cette terminologie.

1.1 Entre topographie et fonction (Fig. 34)

Chimiotopie périphérique: A la suite de notre travail sur les neurones récepteurs olfactifs, nous disposons d'une description de la sélectivité des cellules réceptrices du système olfactif. Au cours d'une des séries d'expériences que nous avons entreprises, nous avons pris soin de noter l'emplacement des cellules enregistrées sur une carte de l'éminence olfactive. Nous avons alors dû constater qu'à l'échelle unitaire, à la périphérie du système olfactif de la grenouille, il n'apparaissait pas de chimiotopie organisée. Ce résultat cadre mal avec les démonstrations de sensibilités spécifiques réparties en régions que l'on obtient chez divers vertébrés avec les enregistrements EOG. Au demeurant, les travaux de Daval et al. (1980) confirment qu'il existe bien de telles variations régionales chez la grenouille. Il est possible de faire simplement appel à la petitesse de l'échantillon de cellules que nous considérons pour expliquer cette différence. En effet, de notre côté, nous rendons compte des profils de sélectivité d'une soixantaine de cellules réparties sur presque la totalité de l'éminence olfactive, alors que, de l'autre côté, chaque point d'enregistrement EOG intègre la réponse de plusieurs centaines, voire de plusieurs milliers de cellules voisines. S'ajoute à ce fait statistique, des profils de sensibilité peu sélectifs des neurones récepteurs olfactifs qui ne permettent pas de leur attribuer un type. Au contraire, il y a une cohérence entre les résultats électrophysiologiques recueillis avec les macro-électrodes et les cartographies que révèlent les hybridations *in situ* des récepteurs. On ne sait pas aujourd'hui expliquer la distribution remarquable des récepteurs dans la muqueuse olfactive, même si on suppose qu'elle trouve son origine sur place, dans quelque programme de développement ontogénétique (Sullivan et al., 1995). Ce qu'on peut raisonnablement admettre, par contre, c'est qu'elle n'est pas significative dans la représentation nerveuse du stimulus. En effet, l'organisation des projections primaires confirmée par les mêmes outils, la convergence glomérulaire, impose un motif spatial dont la contrainte est le partage d'un même récepteur et non pas une origine territoriale. On peut, d'une autre manière, raisonner qu'un dispositif récepteur exposé, ici la muqueuse olfactive, dont les capacités de reconnaissance seraient trop liées à la préservation d'une représentation spatiale aurait un rôle bien difficile à jouer alors qu'il est soumis à des variations permanentes d'accessibilité. Dans la cavité nasale, l'air vecteur d'odeurs, n'accède pas toujours partout!

Chimiotopie glomérulaire: L'organisation en couches concentriques du bulbe olfactif fait que chaque couche peut être projetée dans un plan, un espace à deux dimensions. En fait, en dépit de cette disposition spatiale simple, l'espace neural dans lequel se répartit l'information olfactive dans le bulbe olfactif est beaucoup plus complexe. Le réseau d'interneurones et de dendrites secondaires des deutoneurones qui s'étendent si largement, conduit tangentiellement des influences d'un glomérule à un autre, de cellules mitrales à d'autres, si bien

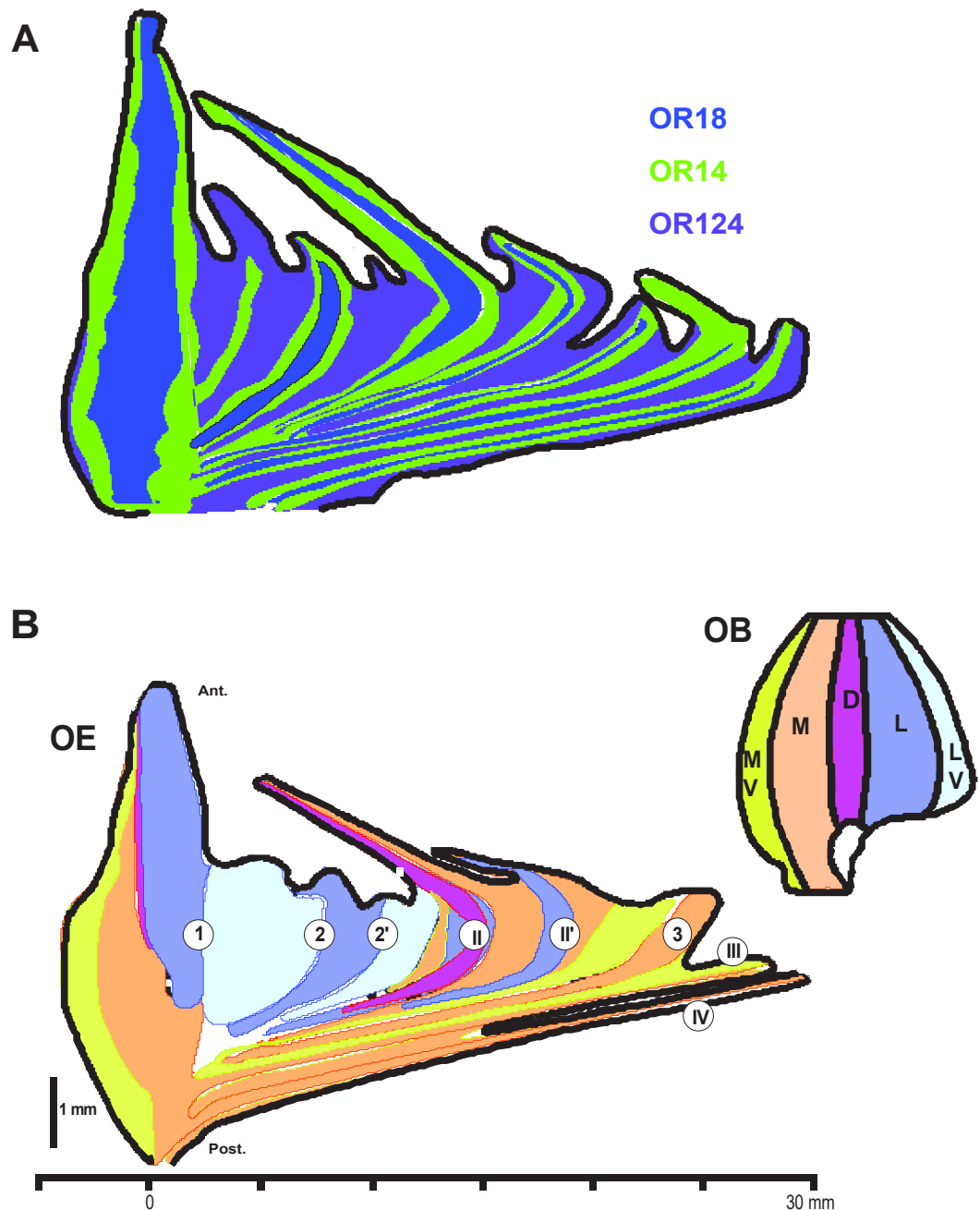


Figure 34: Distribution des récepteurs à sept domaines transmembranaires dans la muqueuse olfactive de rat et organisation topographique des projections épithélio-bulbaires. A- Les neurones récepteurs olfactifs qui portent un même récepteur (ou une même sous-famille) appartenant à la famille découverte par Buck et Axel, 1991, marqués par hybridation in situ des ARNm, sont disposés dans la muqueuse olfactive suivant un plan organisé (d'après Strotmann et al., 1994). Les trois territoires colorés sont occupés par trois récepteurs déjà présentés page 35. Le plan d'organisation s'inscrit dans la carte anatomique présentée en B (d'après Astic et al., 1987), déduite du marquage rétrograde de fibres primaires atteignant de petits territoires de la couche glomérulaire du bulbe olfactif. Ces données montrent que les neurones convergeant sur un ou quelques glomérules adjacents proviennent de territoires épithéliaux étendus et divisés en plusieurs zones étirées selon l'axe antéro-postérieur. De plus, des neurones qui projettent dans la même bande antéro-postérieure bulbaire occupent un même territoire épithélial. On sait, par ailleurs, que des neurones qui portent un même récepteur convergent vers un ou un petit nombre de glomérules olfactifs. On s'attend donc bien à trouver une bonne superposition des deux cartographies. Cette convergence topographique précise pourrait être expliquée par une implication des récepteurs eux-mêmes jouant par leur portion extracellulaire le rôle de signaux de surface guidant les projections axonales épithéliales vers une cible bulbaire (Dreyer, 1998). OE, épithélium olfactif développé dans un plan; 1, 2, 2', 3, ectoturbines; II, II', III, IV, endoturbines; OB, couche glomérulaire olfactive développée; D, zone dorsale, L, latérale, LV, latéro-ventrale, M, médiane, MV, médio-ventrale.

d'ailleurs qu'on a pu déceler fonctionnellement des "colonnes glomérulaires" (Buonviso et Chaput, 1990). On peut considérer que les échanges d'informations entre territoires au travers des fibres interneuronales, constituent un moyen de gérer l'espace. Cependant, ces mêmes fibres peuvent tout aussi bien servir à tenir compte de composantes temporelles dans le message périphérique afférent.

Il n'empêche qu'au niveau glomérulaire, à la fois, les fibres primaires se rassemblent selon le récepteur qu'elles portent et l'activation glomérulaire révélée par la méthode au 2-désoxyglucose se distribue selon le stimulus. Cette distribution d'activité, assez large, est toutefois caractérisée par des foyers de forte activation assez localisés, couvrant plusieurs glomérules. La large étendue de l'activation glomérulaire est confirmée par les études utilisant des colorants potentiels dépendants (Cinelli et al., 1995, Keller et al., 1998). Si l'on admet que les neurones récepteurs qui portent un même récepteur convergent sur un même glomérule, l'étendue des activations dans la couche glomérulaire que nous avons observée, démontre d'abord que le stimulus interagit avec de nombreux types de récepteurs!

La reproductibilité des motifs d'activation, aussi bien chez des individus différents que dans des espèces différentes, telle que nous l'avons montrée, s'accorde bien avec l'hypothèse d'un plan de câblage, en partie, génétiquement programmé. Elle incite aussi à envisager que l'espace bi-dimensionnel de la couche glomérulaire, à l'échelle macroscopique donc, puisse servir de base à une représentation spatiale de l'odeur. Soulignons que s'il existe une contrainte génétique à cette organisation, elle admet une certaine plasticité puisque la cible glomérulaire est plus dispersée après la réafférentation suivant une manipulation génétique ou une lésion des neurones récepteurs (Costanzo, 1997, Wang et al., 1998).

Il existe cependant une série d'expériences, (typiques de la tradition en anatomie fonctionnelle), qui donne une autre idée de la distribution bulbaire de l'information caractéristique du signal olfactif:

En contradiction apparente avec l'idée d'un code de l'odeur spatialement établi, les résultats des expériences de lésions bulbaires montrent que des réponses comportementales olfactivement guidées apprises sont conservées après des lésions localisées ou larges des bulbes olfactifs. Ces expériences pratiquées dans le courant des années quatre-vingt avec des animaux nouveaux nés (Hudson et Distel, 1987, Risser et Slotnick, 1987), viennent d'être reproduites sur des rats adultes (Lu et Slotnick., 1994, 1998). Pour résumer ces dernières expériences, on peut dire que des rats ayant perdu au moins 97% de leurs territoires glomérulaires ne réussissent plus les tests comportementaux de détection ou de discrimination d'odeurs, ils sont considérés comme anosmiques. On note que ce résultat démontre que le système trigéminal seul ne peut pas palier le déficit provoqué par la lésion. Par contre, des rats dont, au moins 23% de la couche glomérulaire est préservée, se comportent presque comme des sujets témoins. Ces résultats sont obtenus alors qu'on réalise les tests comportements entre le 18^{ième} et le 21^{ième} jour suivant la lésion, c'est-à-dire probablement avant qu'une véritable réafférentation fonctionnelle ait pu se mettre en place (Yee et Costanzo, 1995). Selon ces expériences, où la perturbation de l'espace neural est parfois extrême, la dimension spatiale du message, à l'échelle de toute la couche glomérulaire est profondément altérée. Cela implique qu'une partie de l'information olfactive, au moins, celle dont se satisfait l'individu pour réagir de manière adaptée à son environnement chimique n'est pas exclusivement concentrée dans les foyers d'activation glomérulaire!

Comme toujours, l'enveloppe qu'on voit contient l'information. Ses déformations sont significatives, et, à ce titre, les outils qui les visualisent sont grandement utiles. En tous cas, ce que nous retenons des expériences de lésions, c'est que l'information qui caractérise un signal olfactif est largement distribuée dans l'espace neural bulbaire. Notons que cela est d'ailleurs

cohérent avec des profils de sélectivité assez larges tant au niveau des deutoneurones (Motokizawa, 1996) que des neurones récepteurs. Le fait qu'un petit fragment de cet espace apporte suffisamment d'information pour que la reconnaissance de l'odeur soit manifeste suggère que la représentation de l'odeur est multiple ou redondante, pas du tout nécessairement holographique. En effet, nous ne disons pas que *toute* l'information caractéristique d'un odorant est partout présente, mais simplement qu'une part significative, pas forcément la même partout, peut être trouvée dans chaque territoire bulbaire. Par significative, on doit entendre suffisante à la reconstitution perceptuelle du tout.

Si tel est bien le cas, reste à imaginer à quoi peut servir la belle organisation des projections épithélial-bulbaires... D'une part, nous imaginons aisément que, parce que convergente, elle est nécessaire à la sensibilité du système vis à vis des faibles concentrations stimulantes: Elle influe certes sur les seuils de détection mais aussi, et probablement essentiellement, sur les seuils de reconnaissance! Compte tenu des modulations tangentielles autorisées par le réseau bulbaire, nous imaginons que ce réseau participe à l'acquisition d'une "connaissance" sur les stimulus olfactifs, une structuration de la représentation olfactive où des mécanismes récepteurs périphériques indépendants pourraient interagir. La récupération d'une image dégradée vue au travers d'un nombre de récepteurs plus restreint (c'est à dire, ici, en cas de lésion bulbaire expérimentale ou de faible concentration stimulante), n'est bien sûr possible qu'à la condition que l'originale soit inscrite, connue ou mémorisée, à moins que des règles régissant les rapports entre les points ou les territoires différents soient immédiatement calculables (Fig. 35)!

1.2 Sélectivité des neurones olfactifs et spécificité des récepteurs

S'il est possible d'imaginer que le système extrait de l'information du signal chimique, c'est bien sûr parce que le système récepteur est discriminant. Lorsqu'on examine les profils de sensibilité des neurones récepteurs olfactifs, on voit bien qu'en tenant compte de quelques cellules, on obtient une représentation discriminante de tous les odorants que nous avons testés. Rien ne nous assure, malgré tout, que le réseau nerveux fasse le même calcul et que cette information-là, parce qu'elle est discriminante, soit celle qui est prise en compte par le système olfactif! (Ici, encore, nous décrivons une enveloppe). Ce que savons toutefois, c'est que cette information est transmise au réseau bulbaire et qu'elle passe cet étage de traitement, même si l'on reconnaît que ce passage s'accompagne d'une augmentation des distances entre les stimulus, d'un accroissement des capacités de discrimination.

En dernier ressort, la sélectivité des neurones récepteurs olfactifs, dépend de la spécificité des interactions que les protéines réceptrices ont avec les molécules odorantes. Or, nous avons remarqué que nos observations relatives à la sélectivité, "large", des neurones récepteurs de grenouille ou même de souris correspondaient mal à l'hypothèse selon laquelle un seul type de récepteur équipait chaque neurone récepteur.

1.2.1. Interactions protéines - ligands

Une première difficulté, conceptuelle, provient de l'idée que l'on a de la spécificité des interactions entre ligands et protéines en général, qu'elles soient enzymes ou récepteurs, qu'on croit souvent "étroite". Pour les enzymes, la réaction catalysée est, elle, souvent étroitement spécifique. Mais, si parfois la structure chimique du substrat est très étroitement délimitée, certaines protéines enzymatiques sont moins exigeantes, comme la luciférase bactérienne, par

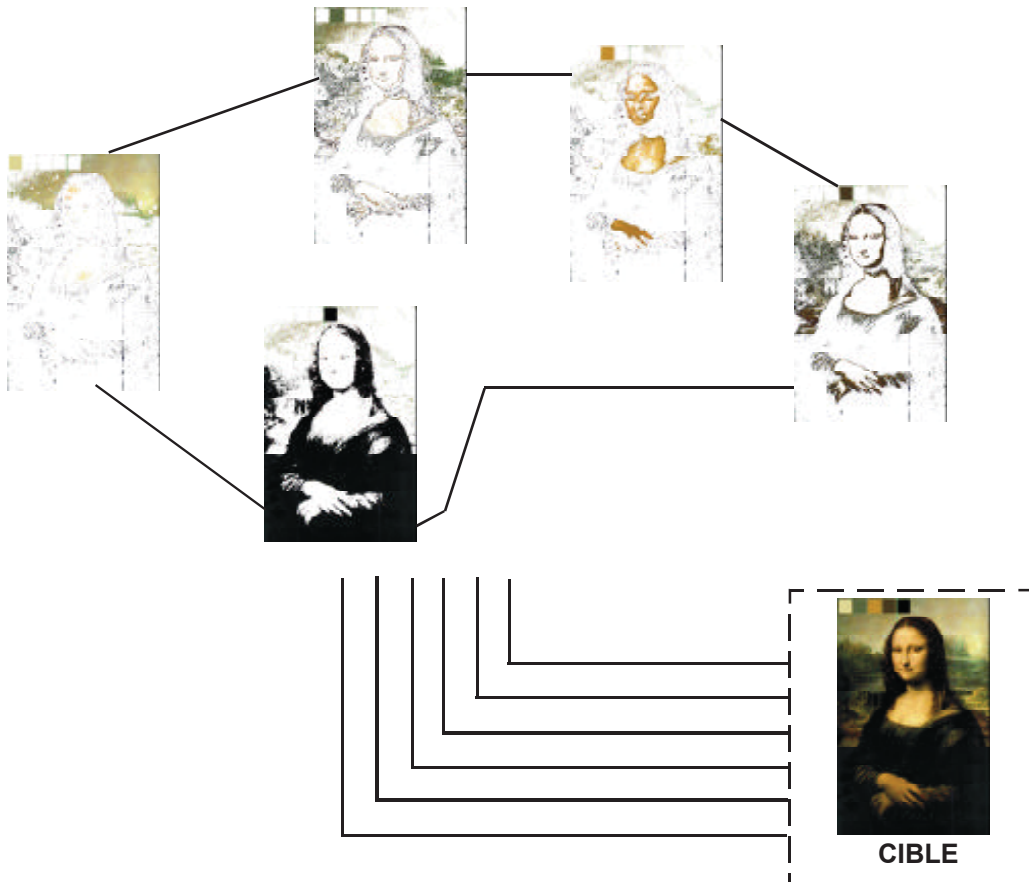
A



Figure 35: Scènes olfactives ou complexités de l'odeur. Il semble que pour le sujet humain, la perception olfactive apparaisse le plus souvent comme une propriété d'objet plutôt que comme un objet (Dubois et al., 1997). Néanmoins, chacun conçoit que l'odeur n'est pas un signal unidimensionnel: Les spécialistes des parfums sont bien capables de nous faire apprécier dans l'odeur de multiples traits qualitatifs mais aussi la dimension temporelle de leurs compositions¹. Il est intéressant de constater, comportementalement, que l'exploration de l'odeur et la reconnaissance des traits olfactifs par ces spécialistes dure et s'ordonne temporellement, manifestant l'exploration d'un espace complexe où nous imaginons qu'il existe, comme dans une scène visuelle, des cohérences ou des rapports logiques, donc perceptibles dans la représentation sensorielle de l'odeur, qui constituent aussi l'information olfactive. Alors, s'il s'agit d'identifier la signification du stimulus, il est probable qu'une fraction de l'information soit suffisante (A), ce qui fait, d'ailleurs, le bonheur des aromaticiens. Ainsi, comme le suggère l'analogie décrite en B, il est concevable qu'une lésion partielle, même étendue, des bulbes olfactifs chez des animaux exploitant fortement leur sens olfactif préserve suffisamment d'informations sur la source pour que le système continue à l'identifier.

¹'A telle essence de rose, nous allons trouver, fraîcheur, fleuri, capiteux, des à-côtés fruités (ou acides), du montant, une douceur suave, ou une âpreté verte et poivrée, elle sera éthérée ou lourde, etc.' E. Roudnitska, 1980.

B



exemple, qui accepte de multiples aldéhydes aliphatiques, de C6 à C20 (Ismailov et al., 1990; Francisco et al., 1993), mettant en oeuvre une propriété reconnue, l'ajustement induit qui augmente les possibilités d'interactions. Un autre exemple est celui de protéines G dont l'activité enzymatique est stimulée directement par le Mastoparan, un tétra-déca-peptide, mais qui interagit aussi avec des molécules aux propriétés structurales apparemment différentes, dont la spermine ou la putrescine (Odagaki et al., 1998).

C'est aussi le cas pour les récepteurs, en particulier de certains récepteurs appartenant la super-famille des récepteurs à sept domaines transmembranaires et associés aux protéines G. Parmi ceux-ci, le cas des récepteurs des opiacés qui admettent des dérivés morphiniques comme ligands et bien sûr des peptides endogènes, des enképhalines, est instructif. Il existerait en fait deux sites d'interaction sur le récepteur μ , l'un, situé sur la première boucle extracellulaire, accueillerait les ligands peptidergiques, alors qu'un site différent accueillerait les ligands non peptidergiques comme la morphine ou la naloxone (Minami et al., 1995, Onogi et al., 1995). De plus, il a été proposé que la liaison des peptides sur un segment extracellulaire soit en fait un mécanisme d'exclusion, assez peu spécifique, prévenant tout de même l'interaction de ligands indésirables avec le site récepteur proprement dit, situé plus profondément dans le domaine transmembranaire du récepteur (Metzger et Ferguson, 1995). Bref, ces quelques exemples donnent une mesure de la complexité de ces interactions protéines-ligands, mais aussi indiquent que la spécificité des interactions ligands protéine est variée, pas toujours aussi étroite qu'on peut le croire. Nous parions qu'on ne fera pas l'économie d'un approfondissement de la connaissance de ces mécanismes pour comprendre la réception olfactive.

Singulièrement, il existe, nous l'avons dit, des protéines de transport dans le mucus olfactif, les *olfactory binding proteins*, OBP, qui semblent avoir une spécificité d'interaction large. Selon Pelosi en effet, un grand nombre de substances odorantes, différentes par leurs structures moléculaires et leurs odeurs, ont une affinité manifeste pour les OBP (Fig. 36). Par contre, aucune des interactions avec les molécules étudiées ne se fait avec une forte affinité; la constante de dissociation du thymol est seulement de 0,1 μ M, la valeur la plus forte observée. Les ligands potentiels sont discriminés par des paramètres d'hydrophobicité ou stéréochimiques (Pelosi, 1994). Ainsi, il est possible d'imaginer qu'une discrimination soit opérée dans le mucus avant même que le système récepteur soit atteint! Malheureusement, l'articulation entre les OBP et le système récepteur n'est pas décrite. Toutefois, le modèle du (E,Z)-6-11 hexadecadienal (bombycal) et de sa *pheromone binding protein*, PBP, indique que la détection de la phéromone chez *Antheraea polyphemus* dépend de la formation d'un complexe ternaire, entre la phéromone, la PBP et le récepteur membranaire (Kaissling, 1996).

1.2.2. Sélectivité des récepteurs des substances odorantes

La question de la spécificité des récepteurs aux odeurs de vertébrés n'est pas tranchée. Les arguments objectifs d'une forte sélectivité des récepteurs olfactifs de vertébrés sont rares. A notre connaissance, seuls 2 cas sur 1000 ont été directement explorés et publiés. Le premier, observé au moyen de l'expression du récepteur OR₅ du rat dans une cellule hôte, permet de constater que, même si tous les stimulus efficaces recrutent tous la voie IP₃, ce sont des structures chimiques différentes, (triméthylamine, acide isovalérique, lyral, métoxy-pyrazine, pyrrolidine) qui semblent activer le récepteur OR₅ (Raming et al., 1993). Le deuxième est en faveur d'une très forte sélectivité, le récepteur I₇ du rat, transfecté par un vecteur viral chez le rat, répond apparemment sélectivement à l'heptanal, à octanal, au nonanal

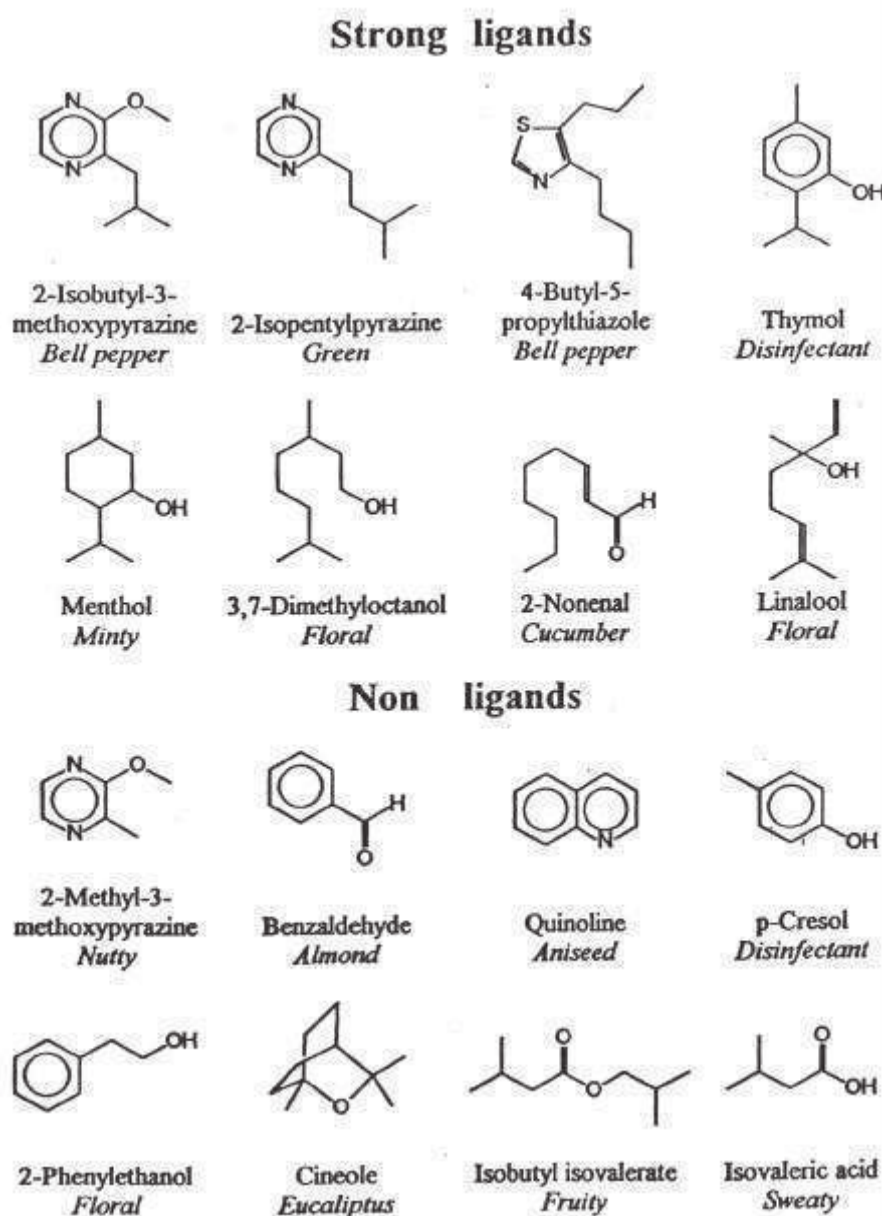


Figure 36: Spécificité des interactions entre les molécules odorantes et la protéine de transport extraite de la muqueuse olfactive bovine (OBP_b). Les molécules qui se lient à l'OBP_b avec un K_D compris entre 0,1 et 1 µM sont considérées comme de bons ligands. Les autres ne se lient pas à l'OBP_b même à des concentrations de 100µM. En plus des molécules indiquées ici, le rétinol, le benzyl benzoate et les muscs tricycliques seraient aussi de bons ligands. D'après Pelosi, 1994.

et décanal, parmi plus de soixante-dix molécules testées, y compris les aldéhydes aliphatiques en C6 ou en C11 et des aldéhydes cycliques de poids moléculaires voisins (Zhao et al., 1998). En ce qui concerne cette dernière expérience, elle semble constituer un bon outil pour examiner assez rapidement, la spécificité des récepteurs. Toutefois, étant donné la variabilité des réponses EOG, il n'est pas certain que de faibles variations spécifiques soient mises en évidence par la méthode¹. Ce n'est d'ailleurs qu'en utilisant des animaux présentant un déficit

¹Randall Reed, au cours d'une réunion à la fondation Jean Marie Delwart, en Belgique, entre le 22 et le 25 octobre 1998, vient de nous annoncer que l'expression du récepteur I7 et d'autres est devenue possible dans une cellule hôte. Il confirme une forte spécificité du récepteur I7.

spécifique qu'on a pu montrer à l'aide d'EOG une augmentation de la sensibilité périphérique faisant suite à la simple présentation répétée du stimulus concerné par le déficit (Wang et al., 1993).

Au contraire, les expériences plus anciennes d'inactivation chimique des récepteurs et de leur protection vis à vis des agents inactivants montraient déjà des atteintes peu spécifiques de la sensibilité de la muqueuse olfactive ligand (Getchell et Gesteland, 1972; Menevse et al., 1978; Delaleu et al., 1983). Cela est cohérent avec l'idée qu'il existe des interactions ligands-récepteurs probablement peu spécifiques, en conséquence mal protégées des traitements inactivants par leurs ligands.

Qu'est-ce que nos propres données apportent par rapport à cette même question? Elles n'atteignent pas directement le niveau du récepteur aux odeurs. Toutefois, elles indiquent sans conteste que:

- très fréquemment, des neurones récepteurs de grenouille ou de souris répondent à des molécules odorantes de structures chimiques variées. Cette information est transmise aux bulbes olfactifs.
- des neurones récepteurs de grenouille répondent à la fois à des substances réputées ne recruter que la voie IP_3 et d'autres réputées ne recruter que la voie AMPc.
- Ajoutons qu'avec A. Duchamp, nous avons constaté que des deutoneurones bulbaires chez la grenouille présentaient ces mêmes deux caractéristiques.

Si on envisage qu'un seul récepteur soit exprimé par neurone récepteur et que ce récepteur seul détermine la sélectivité des neurones récepteurs, alors nous avons démontré que les récepteurs ont souvent une spécificité large! Le fait que les deutoneurones expriment aussi ce type de sélectivité, compte tenu de la règle de convergence glomérulaire, renforcerait cette hypothèse pour peu qu'on admette que l'activation de ces cellules ne provienne que de leur dendrite primaire, connectée à un seul glomérule. Plus probablement, parce que les techniques de biologie moléculaire qui supportent l'hypothèse d'unicité, révèlent en fait des sous-familles (récepteurs ayant plus de 80% d'homologie), nous nous attendons en fait à ce que les neurones récepteurs expriment bien simultanément plusieurs récepteurs de spécificités différentes.

1.2.3. Unicité ou multiplicité des récepteurs portés par un même neurone récepteur?

Mais pour l'instant, les données objectives nous assurant de l'unicité du type de récepteur exprimé par un neurone récepteur olfactif de vertébré manquent. La supposition d'une expression exclusive a été faite mais pas démontrée (Chess et al., 1994; "*Dulac et Axel, donnée non publiée*", Wang et al., 1998), et finalement, tout repose sur les données d'hybridation *in situ* d'ARN messagers d'une vingtaine de récepteurs (soit environ 2% des récepteurs du répertoire du rat!) et une déduction qui tient compte du pourcentage de neurones marqués par une sonde détectant un récepteur donné (soit entre 0,1 et 0,5% de neurones récepteurs marqués par sonde). Il existe des arguments, indirects, contraires. Chez une grenouille, il a été possible de désensibiliser un neurone olfactif à un odorant tout en préservant sa sensibilité à un autre odorant (Kashiwayanagi et al., 1996). D'autres espèces, le homard (Michel et Ache, 1992), la tortue (Kashiwayanagi et Kuhrihara, 1994) et le poisson chat (Ivanova et Caprio, 1993; Kang et Caprio, 1995) semblent bien aussi avoir des neurones récepteurs exprimant simultanément plusieurs sensibilités sélectives commandant éventuellement des voies de transduction différentes. A ce propos, le fait qu'une cellule exprime deux voies de transduction, ce qui est probablement le cas de certains des neurones récepteurs que nous avons enregistrés, n'implique pas nécessairement qu'elle exprime plusieurs récepteurs. Nous avons mentionné en effet, 1) qu'un récepteur peut interagir avec plusieurs protéines G, 2) que certains types de récepteurs possèdent plusieurs sites de liaison, dont on

peut imaginer qu'ils contrôlent plusieurs protéines G et, partant, plusieurs voies de transduction. Comme B. Ache, (Derby et al., 1984a,b), nous envisageons que de telles organisations pourraient jouer un rôle discriminant avantageux pour reconnaître les mélanges. Parmi les neurones récepteurs olfactifs de grenouille que nous avons enregistrés, nombreux sont ceux qui répondent à la fois à des molécules réputées n'activer que la voie AMPc et à des molécules réputées n'activer que la voie IP₃. Selon le même raisonnement, la littérature montre clairement que certains neurones récepteurs de mammifères au moins, chez l'homme ou chez le rat expriment simultanément les deux voies (Tareilus et al., 1995; Rawson et al., 1998).

Mais, existe-t-il des récepteurs à spécificité étroite? Au niveau du neurone récepteur cela signifie qu'avec un échantillon large de structure chimique, nous aurions peu de chances de trouver une réponse. En utilisant une vingtaine de produits stimulants différents chez la grenouille, nous avons toujours constaté que plus d'une cellule sur sept enregistrées ne manifestait pas de réponse. Bien sûr, ces cellules qui présentent toutes une activité spontanée non nulle, pourraient être des neurones immatures, mais probablement pas toutes. En effet, certaines cellules ne répondaient qu'à un stimulus sur vingt testés. En fait, la probabilité de réponse à une substance semble assez constante pour des échantillons de stimulus assez diversifiés (voir par exemple, les figures 3 et 4, Revial et al., 1982). Chez la souris, nous avons rencontré aussi une fort pourcentage de cellules ne présentant aucune réponse, ce qui a été constaté aussi par Bozza et Kauer (1998) chez le rat. Il y a donc de la place, chez ces espèces aussi, pour des neurones récepteurs très sélectifs, qui pourraient n'être équipés que d'un récepteur sélectif comme semble l'être celui caractérisé par Zhao et al., 1998. Reste à savoir s'ils constituent une catégorie particulière, c'est à dire que le système les utilise différemment des neurones les moins sélectifs?

1.3 Comment interpréter un déficit olfactif spécifique?

L'observation d'un déficit sélectif, comme le sont les anosmies spécifiques, n'est pas facilement conciliable avec l'idée d'une multiplicité d'interactions peu spécifiques avec différents récepteurs. Il faut imaginer au moins un récepteur dominant les autres quant à son affinité pour le ligand concerné par l'anosmie spécifique, probablement un récepteur très spécifique. De plus, on s'accommoderait mieux de ce type d'observation, s'il s'agissait d'hyposmies, éventuellement profondes, distinctes donc du déficit présenté par des sujets privés d'olfaction (Fig. 37). Or, de fait, toutes les anosmies spécifiques explorées chez l'homme sont expérimentalement définies comme des hyposmies, puisque le groupe des sujets atteints admet un seuil de détection, bien que généralement dix fois supérieur au moins à celui des sujets normaux, inférieur à celui des sujets ayant une anosmie généralisée (Amoore et al., 1972, 1975, 1976, 1977ab; Pelosi et al., 1978, 1981). Chez la souris, le phénomène que nous avons étudié correspondait bien à la définition d'une hyposmie sélective. En effet, nous avons remarqué que même chez les souris présentant un déficit olfactif spécifique comportementalement observé vis à vis d'une substance odorante, le système olfactif, à un certain niveau de concentration présentait des réactions physiologiques indéniables pour la substance odorante concernée. Un tel phénomène est alors effectivement interprétable en terme de carence ou d'une concentration anormalement faible d'un type (au moins) de récepteur à forte affinité. Cohérent avec cette supposition, la transmission héréditaire de certaines hyposmies spécifiques, comme celle concernant le n-butyl mercaptan (Brown et Robinette, 1967, Whissel-Buechy et Amoore, 1973; Patterson et Lauder, 1984) ou la concordance des valeurs de seuils de détection de l'acétate d'amyle ou d'androsténone chez les jumeaux monozygotes (Wysocki et Beauchamp, 1984; Gross-Isserof et al., 1992; Segal et al., 1992) ont été mises en évidence.

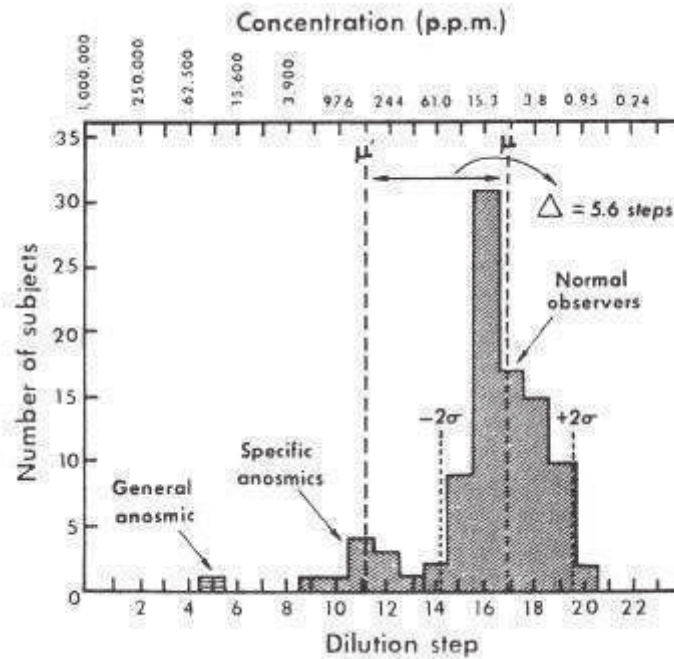


Figure 37: Distribution des seuils de détection à l'acide isovalérique dans un échantillon de population humaine. Sur ce graphe, l'auteur a indiqué que le seuil des sujets atteints d'une anosmie générale est encore plus élevé que celui des sujets qui sont reconnus comme spécifiquement anosmiques à l'acide isovalérique. D'après Amoore, 1968.

S'il est bien périphérique, ce défaut doit avoir pour conséquence une sensibilité périphérique moindre que chez des sujets normalement équipés: C'est bien ce que nous avons observé. Si l'intensité de la stimulation est trop faible, les récepteurs les moins sensibles ne sont plus activés et sont incapables de déclencher la réponse des neurones récepteurs qu'un récepteur plus adapté qui, lui, aurait pu être activé. Compte tenu, d'une projection épithélio-bulbaire spatialement organisée sur la base de l'équipement récepteur, on s'attend bien aussi à observer, au-dessus du seuil de détection, des variations des motifs d'activation glomérulaires, ce que nous avons confirmé. Il est remarquable que les foyers les plus saillants des motifs d'activation soient présents chez les individus atteints comme chez les individus témoins. Cela pourrait être un argument pour dire que même chez les sujets anosmiques spécifiquement à un odorant, le mécanisme récepteur concerné est présent. La méthode au 2 désoxyglucose étant cumulative, le marquage observé rendrait compte de cette présence. Cela aussi permettrait de comprendre la possibilité d'induction de récepteur ou l'augmentation de l'efficacité de la voie de transduction suggérés par l'expérience de Wang et al. (1993) qui démontre l'accroissement de sensibilité par la simple exposition répétée au stimulus de sujets sélectivement hyposmiques. Mais, nous savons que ces foyers représentent plusieurs glomérules et on peut s'attendre à ce qu'ils reflètent l'activation de divers types de récepteurs. Si tel est bien le cas, on devra chercher la raison de ces regroupements glomérulaires, que nous pouvons considérer comme un deuxième niveau de convergence épithélio-bulbaire. Pourraient-ils être expliqués par le fait que plusieurs récepteurs susceptibles de reconnaître la même molécule sont simultanément portés par les neurones qui adopteraient ce mode de convergence? En tout cas, ce modèle, a pris récemment encore plus de valeur, puisqu'une analyse génétique a permis de localiser les gènes

impliqués dans l'hyposmie sélective à l'acide isovalérique de la souris C57BL/6J (Griff et Reed, 1995) et devrait contribuer à mieux définir ce phénomène².

2. De la réception olfactive à la perception de l'odeur

L'un des buts finaux de ces travaux sur les neurones olfactifs est bien sûr de comprendre mieux comment un individu extrait une information du monde chimique qui l'entoure. Il n'est pas question ici de circonscrire cette question. Simplement, nous avons toujours dans notre recherche débattu avec d'autres spécialistes, psycho-cogniticiens ou chimistes, qui avec des outils différents des nôtres tentent tous de donner une définition de l'odeur. Cette confrontation nous a vite fait comprendre que nous avions une vision assez étroite de la notion même d'odeur.

Ayant recueilli des réponses de neurones récepteurs olfactif de grenouille, nous disposons d'une représentation nerveuse d'un échantillon de molécules odorantes que nous connaissions bien (Sicard et Holley, 1984). L'une des descriptions possibles que nous pouvons en donner est une mesure des similitudes de leurs propriétés stimulantes vis à vis des neurones récepteurs, description qui se passe d'ailleurs de référence spatiale. Par ailleurs, nous savions que Maurice Chastrette pouvait établir une description des similitudes de ces mêmes molécules odorantes sur la base d'un savoir physico-chimique (Chastrette, 1981). Ces deux premières descriptions devraient être assez cohérentes entre elles parce qu'elles sont proches, moléculaires, de ce qui détermine l'information olfactive, c'est à dire l'interaction entre le support de l'odeur et l'entité réceptrice. Pour compléter notre faisceau de description, il fallait aussi disposer d'une description de l'odeur, en quelque sorte, ce qui "reste" de cette information lorsque le sujet entier l'exprime. C'est cette description que nous avons voulu obtenir avec Nicolas Godinot en demandant à des sujets naïfs de façon indirecte d'établir des distances entre ces mêmes molécules odorantes, en adoptant un protocole *ad hoc*. Evidemment, les espaces de représentation de ces différentes distances ne sont pas facilement comparables. Nous avons quand même pensé qu'il était possible de considérer qu'une variable ordinale pouvait nous suffire et l'article qui suit rend compte de cette comparaison.

2.1. Article 10: Sicard, G., Chastrette, M. Godinot, N. (1997). Des représentations de l'espace olfactif: Des récepteurs à la perception. *Intellectica*, 24:85-107.

²Randall Reed vient de nous confirmer que dans ce segment génomique, on trouve un *cluster* correspondant à une douzaine de récepteurs à 7 domaines transmembranaires...

3 CONCLUSION GENERALE

Nous venons, en fait, de faire le double constat suivant: d'une part, les neurones récepteurs olfactifs que nous observons paraissent souvent assez peu sélectifs. D'autre part, le déficit sélectif que représente l'hyposmie spécifique nous conduit à admettre l'existence de récepteurs à faible sélectivité, probablement à forte affinité. Jusqu'à la découverte de preuves incontestables, la première constatation peut recevoir, en principe, deux explications: Soit l'on considère qu'il y a un assemblage possible sur ces neurones de n types différents de récepteurs, éventuellement très sélectifs (mais pas nécessairement), soit, à l'extrême et suivant l'hypothèse des spécialistes de la biologie moléculaire selon laquelle un unique récepteur serait exprimé dans chaque neurone récepteur, nous démontrons que le *système récepteur* associé à un neurone récepteur est souvent peu sélectif. Nous utilisons le terme vague de système récepteur à dessein parce que, par exemple, nous aimerions bien savoir si et comment les protéines de transport des molécules odorantes contribuent à la discrimination olfactive.

Au cours de notre discussion, parmi les explications d'une faible sélectivité des neurones récepteurs olfactifs, nous n'avons pas envisagé la possibilité d'un lien fonctionnel entre neurones récepteurs voisins. Pour l'instant, il n'existe, comme support de cette hypothèse, que la démonstration isolée de Graziadei, selon laquelle des épines dendritiques relieraient entre eux certains neurones récepteurs, dans certains territoires, au moins. Cette complexité supplémentaire, devrait être, aujourd'hui, soumise à l'épreuve expérimentale.

D'une autre manière, nous savons que même si les entrées du système olfactif sont peu sélectives, elles sont capables d'assurer la discrimination de molécules odorantes aussi voisines que la quinoline et l'isoquinoline, par exemple: La représentation périphérique de l'odeur sans tenir compte d'une dimension spatiale, hypothétique mais peu crédible, du message est suffisante pour apporter un message discriminant.

L'interaction entre les molécules odorantes et les récepteurs du système olfactif livre très lentement ses secrets. Les données que nous apportons, fonctionnelles, fixent un cadre à d'autres données, structurelles, pour l'instant, que livre la biologie moléculaire. On distingue aujourd'hui des protéines qui sont de bons candidats pour jouer le rôle de récepteurs. Il faut maintenant, pratiquement, décrire leur fonction, leur insertion dans la physiologie de l'olfaction. Plusieurs voies sont possibles, d'une part, la modélisation moléculaire (Singer et al., 1994,1995; Afshar et al., 1998) qui prolonge les études des relations structure-odeur, et d'autre part la voie expérimentale qui peut prendre de multiples formes. Nos travaux de physiologie qui caractérisent la sélectivité des cellules réceptrices du système olfactif des vertébrés, complètent, de façon indispensable encore aujourd'hui, les avancées qu'apportent les outils de la biologie moléculaire. Ils ont aussi attiré le regard des chimistes qui nous ont, à leur tour, bien aidés. Le bilan que nous venons de faire nous conforte donc dans l'idée qu'il faudra encore développer notre regard multidisciplinaire, contre vents et marées, pour mieux comprendre l'odeur, certes, mais aussi le fonctionnement du système olfactif.

Le fait que la cellule olfactive soit en contact avec un environnement chimique est, bien évidemment, un trait commun à toutes les cellules, même si on prête encore aux cellules olfactives quelque caractéristiques inédites. Généralement, ces contacts chimiques participent au réglage des réactions de la cellule à son milieu. Certains d'entre eux sont efficaces dès l'interface membranaires grâce à l'existence de récepteurs assez sélectifs. D'autres régulations s'opèrent parce que la substance chimique pénètre à l'intérieur de la cellule (glucose, hormones). Nous avons mentionné que certains auteurs ont observé que des cellules autres que

des neurones récepteurs olfactifs manifestent une sensibilité à des produits odorants. Ce qui différencie d'abord la réaction olfactive de ces réactions cellulaires probablement ubiquitaires, c'est essentiellement sa sensibilité exquise et son pouvoir de générer des messages parfaitement discriminants pour une si grande variété de stimulus simples ou composés. On ne peut pas toutefois exclure que les mécanismes mis en jeu dans n'importe quelle cellule, le soient aussi dans les neurones olfactifs (Kashiwayanagi et Kurihara, 1996). Pour s'en accommoder, il faut que leur reproductibilité soit grande, ou bien concevoir des mécanismes de protection contre une information qui pourrait être parasite, champ d'investigation aujourd'hui quasiment éludé.

Succès du principe olfactif (et à coup sûr, succès de la biologie moléculaire), on a démontré que ce système chimiosensible pourrait être utilisé ailleurs. Certains récepteurs de type olfactif sont exprimés de manière transitoire dans d'autres lieux du système nerveux, voire dans le tissu cardiaque (Drutel et al., 1995). Des cellules très mobiles comme les spermatozoïdes expriment aussi des récepteurs de la même super-famille, et même un équipement transducteur associé, dont on peut imaginer qu'ils conditionnent un chimiotactisme (Parmentier et al, 1992, Vanderhaegen et al., 1993, 1997). Là donc, la capacité des récepteurs à *guider* des cellules prend tout son sens, celui d'une capacité à distinguer dans le milieu une particularité chimique. Dans un autre registre, les convergences fonctionnelles que démontrent les études d'activations glomérulaires par la stimulation olfactive et les cartographies construites sur la base de l'expression de récepteurs suggèrent aussi un rôle actif, structural, des récepteurs dans le guidage des fibres primaires vers leur cible. Cette règle vient donc s'ajouter ici au principe de stabilisation des synapses entre neurones par leur fonctionnement répété, parmi les règles organisatrices des réseaux nerveux.

Enfin, constatons que l'étude des contacts entre les protéines réceptrices du système olfactif et leurs ligands présente un intérêt pratique pour le choix des stimulus odorants lors d'applications en parfumerie ou dans la création d'arômes. Nous imaginons qu'elle contribuera aussi à une plus large connaissance des interactions entre ligands et récepteurs, en général. Pour ces raisons, pratiques ou fondamentales, l'intérêt de l'étude des neurones récepteurs olfactifs dépasse, désormais, le cadre de la physiologie de l'olfaction.

BIBLIOGRAPHIE : A B C D E F G H I J K L M N O P R S T V W Y Z

- Abe, K., Y. Kusakabe, K. Tanemura, Y. Emori, and S. Arai. 1993. Primary structure and cell-type specific expression of a gustatory G-protein-coupled receptor related to olfactory receptors. *J. Biol. Chem.* 268: 12033-39.
- Adamek, G. D. Gesteland R. G. Mair R. G. Oakley B. 1984. Transduction Physiology of Olfactory Receptor Cilia. *Brain Res.* 310: 87-97.
- Adams, D. R. Jones A. M. Plopper C. G. Serabjit-Singh C. J. Philpot R. M. 1991. Distribution of cytochrome P450 monooxygenase enzymes in the nasal mucosa of hamster and rat. *Am. J. Anat.* 190: 291-98.
- Adler, J., and W. Epstein. 1974. Phosphotransferase-system enzymes as chemoreceptors for certain sugars in *Escherichia coli* chemotaxis. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 71: 289-2899.
- Afshar, M. Hubbard R. E. Demaille J. 1998. Towards structural models of molecular recognition in olfactory receptors. *Biochimie* 80: 129-35.
- Allen, W. K. Akerson R. 1985. Identification of an olfactory receptor neuron subclass: Cellular and molecular analysis during development. *Dev. Biol* 109: 393-401.
- Allen, W. K., and R. Akerson. 1985. Identification of a cell surface glycoprotein family of olfactory receptor neurons with a monoclonal antibody. *J. Neurosci.* 5: 284-96.
- Allison, A. C. 1953. The structure of the olfactory bulbs and its relationships to the olfactory pathways in the rabbit and the rat. *J. Comp. Neurol.* 98: 309-53.
- Amoore, J.E. 1967. Specific anosmia : a clue to the olfactory code. *Nature* 214: 1095-98.
- Amoore, J. E., D. Venstrom, and A. R. Davis. 1968. Measurement of specific anosmia. *Perceptual and Motor Skills* 26: 143-164.
- Amoore, J. E., D. Venstrom, and M. D. Nutting. 1972. Sweaty odor in fatty acids: measurements of similarity, confusion and fatigue. *J. Food Sci* 37: 33-35.
- Amoore, J. E., L. J. Forrester, and R. G. Buttery. 1975. Specific anosmia to 1-pyrroline : the spermy odor. *J. Chem. Ecol.* 1: 299-310.
- Amoore, J. E., and L. J. Forrester. 1976. Specific anosmia to trimethylamine : the fishy primary odor. *J. Chem. Ecol.* 2: 49-56.
- Amoore, J. E., P. Pelosi, and L. J. Forrester. 1977. Specific anosmias to 5 α -androst-16-en-3-one and ω -pentadecalactone : the urinous and musky primary odors. *Chem. Senses Flavor* 2: 401-25.
- Amoore, J. E., L. J. Forrester, and P. Pelosi. 1977. Specific anosmia to isobutyraldehyde. The malty primary odor. *Chem. Senses and Flavor* 2: 267-81.
- Amoore, J. E. 1982. Odor theory and odor classification. In: *Fragrance Chemistry*, Theimer, E.T. (ed.), Academic Press, New York, pp 27-76.
- Andres, K.H., 1966. Der Freinbau der Regio olfactoria von Macrosmatikern. *Z. Zellforsch.*, 69: 140-154.
- Andriason, I., and J. Levetau. 1989. Projection bilatérale de la muqueuse olfactive chez la grenouille. *C.R. Acad. Sci. Paris* 309: 513-18.
- Anholt, R. R. H., U. Aebi, and S. H. Snyder. 1986. A partially purified preparation of isolated chemosensory cilia from the olfactory epithelium of bullfrog, *Rana catesbeiana*. *J. Neurosci.* 6: 1962-69.
- Anholt, R. R. H. Mumby S. M. Stofferer D. A. Girard P. R. Kuo J. F. Snyder S. H. 1987. Transduction proteins of olfactory receptor cells: Identification of guanine nucleotide binding proteins and protein kinase C. *Biochemistry* 26: 788-95.
- Anholt, R. R. H., S. M. Mumby, D. A. Stofferer, P. R. Girard, J. F. Kuo, and S. H. Snyder. 1988. Transduction proteins of olfactory receptor cell AUTs of the salamander olfactory bulb. *Nature* 331: 166-68. *Dev. Br. Res*
- Anholt, R. R. H., and A. M. Rivers. 1990. Olfactory Transduction - Cross-talk between second-messenger systems. *Biochemistry* 29: 4049-54.
- Astic, L., Saucier, D. 1982. Ontogenesis of the functional activity of the rat olfactory bulb: autoradiographic study with the 2-deoxyglucose method. *Dev. Brain Res.*, 2:243-56.
- Astic L., Cattarelli M. 1982. Metabolic mapping of functional activity in the rat olfactory system after a bilateral transection of the lateral olfactory tract. *Brain Res.* 245:17-25.
- Astic, L. Saucier D. 1986. Anatomical mapping of the neuroepithelial projection to the olfactory bulb in the rat. *Brain Res. Bull* 16: 445-54.
- Astic, L. Le Pendu J. Mollicone R. Saucier D. Oriol R. 1989. Cellular expression of H and B antigens in the rat olfactory system during development. *J. Comp. Neurol.* 289:386-94.
- Astic, L. Pellier-Monnin V. Godinot F. 1998. Spatio-temporal patterns of ensheathing cell differentiation in the rat olfactory system during development. *Neuroscience* 84: 295-307.
- Bakalyar, H. A. Reed R. R. 1990. Identification of a specialized adenylyl cyclase that may mediate odorant detection. *Science* 250: 1403-6.
- Balasubramanian, S. Lynch J. W. Barry P. H. 1996. Calcium-dependent modulation of the agonist affinity of the mammalian olfactory cyclic-nucleotide-gated channel by calmodulin and a novel endogenous factor. *J. Membrane Biol.* 152: 13-23.
- Barber PC 1982. Neurogenesis and regeneration in the primary olfactory pathway of mammals. *Bibl Anat* 23:12-25.
- Barber, P. C., and R. M. Lindsay. 1982. Schwann cells of the olfactory nerves contain glial fibrillary acidic protein and resemble astrocytes. *Neuroscience* 7: 3077-90.

- Barber, P. C., and D. Dahl. 1987. Glial fibrillary acidic protein (GFAP)-like immunoreactivity in normal and transected rat olfactory nerve. *Exp. Brain Res.* 65: 681-85.
- Barber, P. C. 1989. Ulex Europaeus agglutinin I binds exclusively to primary olfactory neurons in the rat nervous system. *Neuroscience* 30: 1-9.
- Bardoni, R. Magherini P. C. Belluzzi O. 1996. Excitatory synapses in the glomerular triad of the frog olfactory bulb in vitro. *Neuroreport* 7: 1851-55.
- Bargmann, C. I. Hartwig E. Horvitz H. R. 1993. Odorant-selective genes and neurons mediate olfaction in *C. elegans*. *Cell* 74: 515-27.
- Barthold, S. W. 1988. Olfactory neural pathway in mouse hepatitis virus nasoencephalitis. *Acta Neuropathol* 76: 502-6.
- Baydar, A. E., M. Petrzilka, and M. P. Schott. 1992. Perception of characteristic axillary odors. *Perfumer and Flavorist* 17: 3-9.
- Baylin, F., and D. G. Moulton. 1979. Adaptation and cross-adaptation to odor stimulation of olfactory receptors in the Tiger Salamander. *J. Gen. Physiol* 74: 37-55.
- Beets, 1982. Odor and stimulant structures. In: *Fragrance Chemistry*, Theimer, E.T. (ed.), Academic Press, New York, pp 77-122.
- Bell, G. 1984. 2-deoxyglucose studies reveal topographic coding in the olfactory bulb. *Neurosci. Letters Suppl.* 19: 9.
- Bell, G. A., D. G. Laing, and H. Panhuber. 1987. Odour mixture suppression: evidence for a peripheral mechanism in human and rat. *Brain Res.* 426: 8-18.
- Belluscio, L. Gold G. H. Nemes A. Axel R. 1998. Mice deficient in Golf are anosmic. *Neuron* 20: 69-80.
- Benson, T. E., G. D. Burd, C. A. Greer, D. M. D. Landis, and G. M. Shepherd. 1985. High-resolution 2-deoxyglucose autoradiography in quick-frozen slabs of neonatal rat olfactory bulb. *Brain Res.* 339: 67-78.
- Berglund, B., Berglund, U., Engen, T., Ekman, G. 1973. Multidimensional analysis of twenty-one odors. *Scand. J. Psychol.* 14: 131-137.
- Berkowicz DA, Trombley PQ, Shepherd GM 1994. Evidence for glutamate as the olfactory receptor cell neurotransmitter. *J. Neurophysiol.* 71:2557-61.
- Bermudez-Rattoni, F., Coburn, K.L., Fernandez, J., Chavez, A.F., Garcia, J. 1987. Potentiation of odor by taste and odor aversion in rats are regulated by cholinergic activity in dorsal hippocampus. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 265:553-9.
- Bianchet MA, Bains G, Pelosi P, Pevsner J, Snyder SH, Monaco HL, Amzel LM, 1996. The three-dimensional structure of bovine odorant binding protein and its mechanism of odor recognition. *Nat. Struct. Biol.* 3:934-9.
- Bignetti, E., G. Damiani, P. De Negri, R. Ramoni, F. Avanzini, G. Ferrari, and G. L. Rossi. 1987. Specificity of an immunoaffinity column for odorant-binding protein from bovine nasal mucosa. *Chem. Senses* 12: 601-8.
- Blache, P. Gros L. Salazar G. Bataille D. 1998. Cloning and tissue distribution of new rat olfactory receptor-like (OL2). *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 242: 669-72.
- Bockaert, J. Pin J. P. 1998. Utiliser un récepteur couplé aux protéines G pour communiquer. Un succès évolutif. *C.R. Acad. Sci. Paris* 321: 529-620.
- Boekhoff, I. Tareilus E. Strotmann, J., Breer H. 1990. Rapid activation of alternative second messenger pathways in olfactory cilia from rats by different odorants. *The EMBO Journal* 9: 2453-58.
- Boekhoff, I., and H. Breer. 1990. Differential stimulation of second messenger pathways by distinct classes of odorants. *Neurochem. Int.* 17: 553-57.
- Boekhoff, I., J. Strotmann, K. Raming, E. Tareilus, and H. Breer. 1990. Odorant-sensitive phospholipase C in insect antennae. *Cellular Signaling* 2: 49-56.
- Boekhoff, I. Breer H. 1992. Termination of second messenger signaling in olfaction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 471-74.
- Bogdanffy, M. S., H. W. Randall, and K. T. Morgan. 1987. Biochemical quantitation and histochemical localization of carboxylesterase in the nasal passages of the Fisher-344 rat and B6C3F1 mouse. *Toxicol. Appl. Pharmacol* 88: 183-94.
- Bogdanffy, M. S., P. H. Morgan, T. B. Starr, and K. T. Morgan. 1987. Binding of formaldehyde to human and rat nasal mucus and bovine serum albumin. *Toxicol. Letters* 38: 145-54.
- Bojsen-Moller F.R. 1964. Topography of the nasal glands in rats and some other mammals. *Anat. Rec.* 150: 11-24.
- Bojsen-Moller, F. R. 1975. Demonstration of terminalis, olfactory trigeminal and perivascular nerves in the rat nasal septum. *J. Comp. Neurol.* 159: 245-56.
- Borisy, F. F., R. Hen, G. V. Ronnett, and S. H. Snyder. 1992. Dynamics of cyclic AMP regulation in olfaction cell lines. *Achems XII, Abstracts*: 555.
- Bouvet, J. F. Delaleu A. Holley A. 1984. Réponses électriques de la muqueuse olfactive de Grenouille à l'application d'acétylcholine et de substance P. *C.R. Acad. Sc. Paris, III* 298: 6.
- Bouvet, J. F. Delaleu J. C. Holley A. 1987. The activity of olfactory receptor cells is affected by acetylcholine and substance P. *Neurosci. Res.* 5: 214-23.
- Bouvet, J. F. Godinot F. Croze S. Delaleu J. C. 1987. Trigeminal substance P-like immunoreactive fibres in the frog olfactory mucosa. *Chem. Senses* 12: 499-505.
- Bouvet, J. F., J. C. Delaleu, and A. Holley. 1987. Olfactory receptor cell function is affected by trigeminal nerve activity. *Neurosci. Letters* 77:181-186.
- Bozza, T.C., Kauer, J.S. 1998. Odorant responses properties of convergent olfactory receptor neurons. *J. Neuroscience* 18:4560-69.
- Bradley, J. Li J. Davidson N. Lester H. A. Zinn K. 1994. Heteromeric olfactory cyclic nucleotide-gated channels: a new subunit that confers increased sensitivity to cAMP. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 8890-8894.
- Brandt, I., E. B. Brittebo, V. J. Feil, and J. E. Bakke. 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.
- Breer, H. Klemm T. Boekhoff I. 1992. Nitric oxide mediated formation of cyclic GMP in the olfactory system. *Neuroreport* 3: 1030-1032.
- Breipohl, W., H. J. Laugwitz, and N. Bornfeld. 1974. Topological relations between the dendrites of olfactory sensory cells and sustentacular cells in different vertebrates. An ultrastructural study. *J. Anat.* 117: 89-94.
- Breipohl, W., A. S. Mendoza, and F. Miragall. 1982. Freeze fracturing studies on main and vomeronasal olfactory sensory epithelia in NMRI-mice. in *Olfaction and Endocrine Regulation*, IRL Press, London *: 309-22.
- Bronshtein, A. A., and A. V. Minor. 1977. The regeneration of olfactory flagella and restoration of electroolfactogram after the treatment of olfactory mucosa with Triton X-100. *Tsitologiya* 19: 33-39.
- Brown, C. E., F. L. Margolis, T. H. Williams, R. G. Pitcher, and G. Elgar. 1977. Carnosine in olfaction proton magnetic resonance spectral evidence for tissue-specific carnosine binding sites. *Neurochem. Res.* 2: 555-79.
- Brown, D., L.M., Garcia, and L. Orci, 1984. Carbonic anhydrase is present in olfactory receptor cells. *Histochemistry*, 80:307-9.
- Brown, K. S., and R. R. Robinette. 1967. No simple pattern of inheritance in ability to smell solutions of cyanide. *Nature* 215: 406-8.
- Brunet, L. J. Gold G. H. Ngai J. 1996. General anosmia caused by a targeted disruption of the mouse olfactory cyclic nucleotide-gated cation channel. *Neuron* 17: 681-93.
- Buck, L., Axel, R. 1991. A novel multigene family may encode odorant receptors: A molecular basis for odor recognition. *Cell*, 65: 175-187.
- Buonviso, N. Chaput M. 1990. Response similarity to odors in olfactory bulb output cells presumed to be connected to the same glomerulus: Electrophysiological study using simultaneous single-unit recordings. *J. Neurophysiol.* 63: 447-54.
- Burd, D. G., B. J. Davies, F. Macrides, M. Grillo, and F. L. Margolis. 1982. Carnosine in primary afferents of the olfactory system: an autoradiographic and biochemical study. *J. Neurosci* 2: 244-55.
- 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., and C. L. Murphy. 1980. Interaction between chemoreceptive modalities of odour and irritation. *Nature* 284: 255-57.
- Camara, C. G., and J. W. Harding. 1984. Thymidine incorporation in the olfactory epithelium of mice: early exponential response induced by olfactory neurectomy. *Brain Res.* 308: 63-68.
- Carmichael, K.A., Jennings, A.S., Doty, R.L. 1984. Reversible anosmia after pituitary irradiation. *Ann. Intern. Med.*, 100: 532-3.
- Carr, V. M. Farbman A. I., L. M. Colletti, and J. I. Morgan. 1991. Identification of a new non-neuronal cell type in rat olfactory epithelium. *Neuroscience* 45: 443-49.
- Chaput, M. A., and A. Holley. 1976. Olfactory bulb responsiveness to food odour during stomach distension in the rat. *Chem. Senses and Flavor* 2: 189-201.
- Chaput, M. A., and A. Holley. 1985. Responses of olfactory bulb neurons to repeated odor stimulations in awake freely-breathing rabbits. *Physiol. Behav* 34: 249-58.
- Chaput, M. A., and M. J. Lankheet. 1987. Influence of stimulus intensity on the categories of single-unit responses recorded from olfactory bulb neurons in awake freely-breathing rabbits. *Physiol. and Behav* 40: 453-62.
- Chastrette, M. 1981. An approach to a classification of odours using physicochemical parameters. *Chem. Senses* 6: 157-63.
- Chastrette, M., D. Zakarya, and A. Elmouaffek. 1986. Relations structure-odeur dans la famille des muscs benzeniques nitrés. *Eur. J. Med. Chem. - Chim. Ther* 21: 505-10.
- Chastrette, M., A. Elmouaffek, and P. Sauvegrain. 1988. A multidimensional statistical study of similarities between 74 notes used in perfumery. *Chem. Senses* 13: 295-305.
- Chastrette, M., and D. Zakarya. 1988. Sur le rôle de la liaison hydrogène dans l'interaction entre les récepteurs olfactifs et les molécules à odeur de musc. *C.R. Acad. Sci., Paris* 307: 1185-88.
- Chen WR, Shepherd GM 1997. Membrane and synaptic properties of mitral cells in slices of rat olfactory bulb. *Brain Res*, 745:189-96.
- Chen, T.Y. Peng Y. W. Dhallan R. S. Ahamed B. Reed R. R. Yau K. W. 1993. A new subunit of the cyclic nucleotide-gated cation channel in retinal rods. *Nature* 362: 764-67.
- Chen T.Y., Yau KW, 1994. Direct modulation by Ca(2+)-calmodulin of cyclic nucleotide-activated channel of rat olfactory receptor neurons. *Nature* 368:545-8.
- Chen, Z., Pace U, Heldman J, Shapira A, Lancet D. 1986. Isolated frog olfactory cilia: a preparation of dendritic membranes from chemosensory neurons. *J Neurosci* 6:2146-54.
- Chen, Z., and D. Lancet. 1984. Membrane proteins unique to vertebrate olfactory cilia: Candidates for sensory receptor molecules. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* 81: 1859-63.
- Chess, A., Simon, I., Cedar, H., Axel, R. Allelic inactivation regulates olfactory receptor gene expression. *Cell*, 78: 823-834.
- Chiu, D., T. Nakamura, and G. H. Gold. 1987. Ionic composition of toad olfactory mucus measured with ion selective microelectrodes. *Achems, Sarasota, Abstract*.
- Cinelli, A. Hamilton K. A. Kauer J. S. 1995. Salamander olfactory bulb neuronal activity observed by video rate, voltage-sensitive dye imaging. III Spatial and temporal properties of responses evoked by odorant stimulation. *J. Neurophysiol.* 73: 2053-71.
- Coates, E. L., and G. O. Ballam. 1990. Olfactory Receptor Response to CO₂ in Bullfrogs. *American J. Physiol.* 258:

- R1207-R1212.
- Colbert, H. A. Bargmann C. I. 1995. Odorant-specific adaptation pathways generate olfactory plasticity in *C. elegans*. *Neuron* 14: 803-12.
- Coronas V, Féron F, Hen R, Sicard G, Jourdan F, Moysé E. In vitro induction of apoptosis or differentiation by dopamine in an immortalized olfactory neuronal cell line. *J Neurochem* 69:1870-81.
- Costanzo, R. M., and M. M. Mozell. 1976. Electrophysiological evidence for a topographical projection of the nasal mucosa onto the olfactory bulb of the frog. *J. Gen. Physiol* 68: 297-312.
- Costanzo, R. M., And R. J. O'Connell. 1978. Spatially organized projections of hamster olfactory nerves. *Brain Research* 139: 327-33.
- Costanzo, R. M. 1997. Do odor maps change after recovery from olfactory nerve transection? *ISOT XII and AChems XIX, 7-12 July, 1997, San Diego, USA. Abstract*: pp37.
- Cunningham, A. M., D. K. Ryugo, A. H. Sharp, R. R. Reed, and S. H. Ronnet G. V. Snyder. 1993. Neuronal inositol 1,4,5-trisphosphate receptor localized to the plasma membrane of olfactory cilia. *Neurosci.* 57: 339-52.
- Cuschieri, A. 1974. Enzyme histochemistry of the olfactory mucosa and vomeronasal organ in the mouse. *J. Anat* 118: 477-89.
- Cuschieri, A., and L. H. Bannister. 1974. Some histochemical observations on the muco-substances in the nasal glands of the mouse. *Histochem. J* 6: 543-58.
- Dahl, A. R., W. M. Hadley, F. F. Hahn, J. M. Benson, and R. O. McClellan. 1982. Cytochrome P-450 dependent monooxygenases in olfactory epithelium of dogs: Possible role in tumorigenicity. *Science* 216: 57-59.
- Dahl, A. R. 1989. The cyanide-metabolizing enzyme rhodanese in rat nasal respiratory and olfactory mucosa. *Toxicol. Letters* 45: 199-205.
- Dahmen, N. Wang H-L Margolis F. L. 1992. Expression of olfactory receptors in *Xenopus* Oocytes. *J. Neurochem.* 58: 1176-79.
- Daval, G., J. Leveteau, and P. MacLeod. 1980. Topographical analysis of the activity of the frog olfactory epithelium. *J. Physiol., Paris.* 76:559-67.
- Daval, G., J. Leveteau, and P. MacLeod. 1970. Electroolfactogramme local et discrimination olfactive chez la grenouille. *J. Physiol., Paris* 62: 477-88.
- Dawson, T. M. Arriza J. L. Jarworsky D. E. Borisy F. F. Attramadal H. Lefkowitz R. J. Ronnett G. V. 1993. β -adrenergic receptor kinase-2 and arrestin-2 as mediators of odorant-induced desensitization. *Science* 259: 825-29.
- De Monasterio, F. M., S. J. Schein, and E. P. Maccrane. 1981. Staining of blue-sensitive cones of the macaque retina by a fluorescent dye. *Science* 213: 278-1281.
- Delaleu, J. C., A. Holley. 1980. Modification of transduction mechanisms in the frog's olfactory mucosa using a thiol reagent as olfactory stimulus. *Chem. Senses*, 5: 205-18.
- Delaleu, J. C., A. Holley. 1983. Investigations of the discriminative properties of the frog's olfactory mucosa using a photoactivable odorant. *Neuroscience Letters* 37: 251-56.
- Delaleu, J.C., G. Sicard, 1995. Physiological and histological recovery of the olfactory mucosa of the frog after a dichlonenil injection. *Chem Senses*, 20:433-40.
- Dellacorte, C. Kalinoski D. L. Huque T. Wysocki C. J. Restrepo D. 1995. NADPH diaphorase staining suggests localization of nitric oxide synthase within vertebrate olfactory neurons. *Neuroscience* 74: 215-25.
- DeLong, R. E., and T. V. Getchell. 1987. Nasal respiratory function vasomotor and secretory regulation. *Chem. Senses* 12: 3-36.
- Demski, L. S., and R. G. Northcutt. 1983. The terminal nerve : a new chemosensory system in Vertebrates? *Science* 220: 435-37.
- Derby, C. D., and B. W. Ache. 1984. Quality coding of a complex odorant in an invertebrate. *J. of Neurophysiology* 51: 906-24.
- Derby, C. D., K. A. Hamilton, and B. W. Ache. 1984. Processing of olfactory information at three neuronal levels in the spiny lobster. *Brain Res.* 300: 311-19.
- Dhallan, R. S., K-W Yau, K. A. Schrader, and R. R. Reed. 1990. Primary structure and functional expression of a cyclic nucleotide- activated channel from olfactory neurons. *Nature* 347: 184-87.
- Dohlman H.G., J. Thorner, 1997. RGS proteins and signaling by heterotrimeric G proteins. *J. Biol. Chem.*, 272: 3871-3874
- Doty, R. L. 1975. Intranasal trigeminal detection of chemical vapors by humans. *Physiol. Behav.* 14: 855-859.
- Doty, R. L., W. E. Brugger, P. C. Jurs, M. A. Orndorff, P. J. Snyder, and L. D. Lowry. 1978. Intranasal trigeminal stimulation from odorous volatiles: Psychometric responses from anosmic and normal humans. *Physiol. Behav.* 20: 175-85.
- Doving, K.B. 1966 Analysis of odour similarities from electrophysiological data. *Acta Physiol. Scand.* 68: 404-418.
- Doving, K.B. 1987 Response properties of neurones in the rat olfactory bulb to various parameters of odour stimulation. *Acta Physiol. Scand.* 130: 285-98.
- Dreesen, T. D., and R. B. Koch. 1982. Odorous chemical perturbations of (Na⁺, K⁺)-dependent ATPase activities. *Biochem. J.* 203: 69-75.
- Dreyer, W. J. 1998. The area code hypothesis revisited: olfactory receptors and other related transmembrane receptors may function as the last digits in a cell surface code for assembling embryos. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 9072-77.
- Drutel, G. Arrang J-M. Wisniewsky C. Schwartz K. Schwartz J-C. 1995. Cloning of ol1, a putative olfactory receptor and its expression in the developing Rat heart *Receptors Channels* 3: 33-40.
- Dubois, D., C. Rouby, G., Sicard. 1997 Catégories sémantiques et sensorialités: de l'espace visuel à l'espace olfactif. In: L'odorat chez l'enfant: perspectives croisées. Textes rassemblés par B. Schaal. Enfance, 1, PUF, Vendôme,

- 1997, pp: 141-151.
- Dubois-Dauphin, M., E. Tribollet, and J. J. Dreyfus. 1981. Relations somatotopiques entre la muqueuse olfactive et le bulbe olfactif chez le triton. *Brain Res.* 219: 969-287.
- Duchamp, A. 1982. Electrophysiological responses of olfactory bulb neurons to odor stimuli in the frog. A comparison with receptor cells. *Chem. Senses* 7: 191-210.
- Duchamp, A., Sicard G. 1984. Odour discrimination by olfactory bulb neurons: Statistical analysis of electrophysiological responses and comparison with odour discrimination by receptor cells. *Chem. Senses* 9: 1-14.
- Duchamp, A., Sicard G. 1984. Influence of stimulus intensity on odour discrimination by olfactory bulb neurons as compared with receptor cells. *Chem. Senses* 8: 355-66.
- Duchamp-Viret, P., A. Duchamp, and G. Sicard. 1990. Olfactory discrimination over a wide concentration range. Comparison of receptor cell and bulb neurons abilities. *Brain Res.* 517: 256-62.
- Duchamp-Viret P, Duchamp A. 1997. Odor processing in the frog olfactory system. *Prog Neurobiol.* 53:561-602.
- Duveau, A., and Gerebtzoff. 1967. Caractères histochimiques de la muqueuse olfactive. *C.R. Soc. Biol.*, 161: 1576-80.
- Dwyer, D., N. Troemel E. R. Sengupta P. Bargmann C. I. 1998. Odorant receptor localization to olfactory cilia is mediated by ODR-4, a novel membrane-associated protein. *Cell* 93: 455-66.
- Ebbeson, S. O. E, and G. T. Bazer. 1987. Double labeling of neural circuits using horse radish peroxidase and cobalt. *J. Neurosci. Methods* 20: 1-5.
- Eccles, R., and R. L. Lee. 1981. Nasal vasomotor oscillations in the cat associated with the respiratory rhythm. *Acta Otolaryngol.* 92: 357-61.
- Eccles, R., D. H. Griffiths, Newton C.G., and N. S. Tolley. 1988. The effects of menthol isomers on nasal sensation of airflow. *Clin. Otolaryngol.* 13: 25-29.
- Eccles, R., M. S. M. Jawad, and S. Morris. 1989. Olfactory and trigeminal thresholds and nasal resistance to airflow. *J. Otolaryngol.* 108: 268-75.
- Edwards, D. A., R. A. Mather, and G. H. Dodd. 1988. Spatial variation in response to odorants on the rat olfactory epithelium. *Experientia* 44: 208-11.
- El-Husseini, AED Bladen C. Vincent S. R. 1995. Expression of the olfactory cyclic nucleotide-gated channel in the rat brain. *Neuroreport* 6: 1459-63.
- Eminet, B. Chastrette, M., 1983. Discrimination of camphoraceous substances using physico-chemical parameters. *Chem. Senses*, 7:293-300.
- Ezeh, P. I. Davis L. M. Scott J. W. 1995. Regional distribution of rat electroolfactogram. *J. Neurophysiol.* 73: 2207-20.
- Fadool, D. A. Ache B. W. 1992. Plasma membrane inositol 1,4,5-triphosphate-activated channels mediate signal transduction in lobster olfactory receptor neurons. *Neuron* 9: 907-18.
- Farbman, A.I., Margolis, F.L. 1980. Olfactory marker protein during ontogeny: immunohistochemical localization. *Dev. Biol.*, 74: 205-215.
- Farbman, A. I., and L. M. Squinto. 1985. Early development of olfactory receptor cell axons. *Dev. Brain Res.* 19: 205-213.
- Farbman, A.I., 1992 Cell biology of olfaction. Cambridge University Press, NY.
- Féron, F., Mackay-Sim, A., Andrieu, J.L. Matthaei, K., Holley, A. , Sicard, G. 1999. Stress induces neurogenesis in non-neuronal cell cultures of adult olfactory epithelium, *Neuroscience*, 88:571-83.
- Ferriero, D., and F. L. Margolis. 1975. Denervation in the primary olfactory pathway of mice. II Effects on carnosine and other amine compounds. *Brain Res.* 94: 75-86.
- Fesenko, E. E., V. I. Novoselov, G. A. Pervukhin, and N. K. Fesenko. 1977. Molecular mechanisms of odor-sensing: II Studies of fraction from olfactory tissue scrapings capable of sensitizing artificial lipid membranes to action of odorants. *Biochim. Biophys. Acta* 466: 347-56.
- Fesenko, E. E., V. I. Novoselov, L. D. Krappivinskaya, N. F. Mjasoedov, and J. A. Zolotarec. 1983. Molecular mechanisms of odor-sensing: VI Some biochemical characteristics of a possible receptor for amino-acids from the olfactory epithelium of the skate *dasyatis pastnaca* and carp *cyprinus carpio*. *Biochim. Biophys. Acta* 759: 250-56.
- Fesenko, E. E., V. I. Novoselov, and J. V. Novikov. 1985. Molecular mechanisms of olfactory reception: VI Kinetic characteristics of camphor interaction with binding sites of rat olfactory epithelium. *Biochim. Biophys. Acta* 839: 268-75.
- Fesenko, E. E., V. I. Novoselov, and M. F. Bystrova. 1987. The subunits of specific odor-binding glyco-proteins from rat olfactory epithelium. *FEBS Letters* 219: 224-26.
- Fesenko, E. E., V. I. Novoselov, and M. F. Bystrova. 1988. Properties of odour-binding glycoproteins from rat olfactory epithelium. *Biochim. Biophys. Acta* 937: 369-78.
- Firestein, S. Werblin, F.S. 1987 Gated currents in isolated olfactory receptor neurons of the larval tiger salamander. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84: 6292-6296
- Firestein, S. Darrow B. Shepherd G. M. 1991. Activation of sensory current in salamander olfactory receptor neurons depends on a G protein-mediated cAMP second-messenger system. *Neuron* 6: 825-35.
- Firestein, S., F. Zufall, and G. M. Shepherd. 1991. Single odor-sensitive channels in olfactory receptor neurons are also gated by cyclic nucleotides. *J. Neurosci.* 11: 3565-72.
- Foster, J. D., M. L. Getchell, and T. V. Getchell. 1991. Identification of sugar residues in secretory glycoconjugates of olfactory mucosae using lectin histochemistry. *Anat. Rec.* 229: 525-44.
- Francisco WA, Abu-Soud HM, Baldwin TO, Raushel FM. Interaction of bacterial luciferase with aldehyde substrates and inhibitors. *J Biol Chem.* 268:24734-41.
- Freitag, J. Krieger J. Strotmann J. Breer H. 1995. Two classes of olfactory receptors in *Xenopus laevis*. *Neuron* 15: 1383-

- 92.
- Frings, S. Lynch J. Lindemann B. 1992. Properties of cyclic nucleotide-gated channels mediating olfactory transduction: Activation, Selectivity and blockage. *J. Gen. Physiol.* 100: 45-67.
- Frosch, M. P., and M. A. Dichter. 1984. Physiology and pharmacology of olfactory bulb neurons in dissociated cell culture. *Brain Res.* 290: 321-32.
- Fujita, S.C., Mori, K., Imamura, K., Obata, K., 1985 Subclasses of olfactory receptor cells and their segregated central projections demonstrated by a monoclonal antibody. *Brain Res.*, 326: 192-6.
- Fülle HJ, Vassar R, Foster DC, Yang RB, Axel R, Garbers DL 1995. A receptor guanylyl cyclase expressed specifically in olfactory sensory neurons. *Proc Natl Acad Sci USA* 92:3571-5.
- Garcia, J., Koelling, R.A. 1967. A comparison of aversion induced by X-rays, toxins and drugs in rats. *Radiat. Res.*, Suppl. 7:439-50.
- Gasser, H. S. 1956. Olfactory nerve fibers. *J. Gen. Physiol* 39: 473-96.
- Gat, U. Nekrasova E. Lancet D. Natchin M. 1994. Olfactory receptor proteins: expression, characterization and partial purification. *Eur. J. Biochem.* 225: 1157-68.
- Gennings, J. N., D. B. Gower, and L. H. Bannister. 1977. Studies on the receptors to 5alpha-androst-16-en-3alpha-ol in Sow nasal mucosa. *Biochim. Biophys. Acta* 496: 47.
- Genter, M. B. Owens D. M. Carlone H. B. Crofton K. M. 1996. Characterization of olfactory deficits in the rat following administration of 2,6 dichlorobenzonitrile (dichlobenil), 3,3'-iminodipropionitrile or methimazole. *Fundam. Appl. Toxicol.* 29: 71-77.
- Gervais, R., and J. Pager. 1979. Combined modulating effects of the general arousal and the specific hunger arousal on the olfactory bulb responses in the rat. *Electroencephalography and Clinical Neurophysiol.* 46: 87-94.
- Gervais, R., and J. Pager. 1979. Unilateral lesions of the olfactory tubercle modifying general arousal effects in the rat olfactory bulb. *Electroencephal. and Clin. Neurophysiol.* 46: 665-74.
- Gesteland, R.C., Howland, B., Lettvin, J.Y., Pitts, W.H. 1959. Comments on micro-electrodes. *Proc. Ire*, 47: 1856-1862.
- Gesteland, R.C., Lettvin, J.Y., Pitts, W.H., Rojas, A. 1963. Chemical transmission in the nose of the frog. *J. Physiol. London*, 181: 525-59.
- Gesteland, R.C., Yancey, R.C., Farbman, A.I., 1982. Development of olfactory receptor neuron selectivity in the rat foetus. *Neuroscience*, 7:3317-36.
- Getchell, M. L., and R. C. Gesteland. 1972. The chemistry of olfactory reception: Stimulus specific protection from sulfhydryl reagent inhibition. *Proc. Nat. Acad. Sci., USA* 69: 1494-98.
- Getchell T. V. 1974 Unitary responses of frog olfactory epithelium to sterically related molecules at low concentrations. *J. Gen. Physiol.*, 64: 241-61.
- Getchell, T. V. 1977. Analysis of intracellular recordings from salamander olfactory epithelium. *Brain Res.* 123: 275-86.
- Getchell, T. V., G. L. Heck, J. A. DeSimone, and S. T. Price. 1980. The location of olfactory receptor sites inference from latency measurements. *Biophys. J* 29: 397-412.
- Getchell, M. L., and T. V. Getchell. 1984. β -Adrenergic regulation of the secretory granule content of acinar cells in olfactory glands of the salamander. *J. Comp. Physiol* 155: 435-43.
- Getchell, T. V., F. L. Margolis, and M. L. Getchell. 1984. Perireceptor and receptor events in vertebrate olfaction. *Prog. Neurobiol.* 23: 317-45.
- Getchell, M. L., J. A. Rafols, and T. V. Getchell. 1984. Histological and histochemical studies of the secretory components of the salamander olfactory mucosa: effects of isoproterenol and olfactory nerve section. *Anat. Rec.* 208: 553-65.
- Getchell T. V. 1988. Induction of odorant-evoked current transients in the *Xenopus* oocytes injected with mRNA isolated from the olfactory of *Rana pipiens*. *Neurosci. Lett.* 91:217-21
- Getchell, M.L., Chen, Y., Sparks, D.L., Ding, X., Getchell, T.V. 1993. Immunohistochemical localization of a cytochrome P-450 isoenzyme in human nasal mucosa: Age-related trends. *Ann. Otol. Rhin. Laryngol.* 102:368-74.
- Gether, U. Johansen T. E. Snider R. M. Lowe III J. A. Nakanishi S. Schwartz T. W. 1993. Different binding epitopes on the NK1 receptor for substance P and a non-peptide agonist. *Nature* 362: 345-48.
- Gilbert, A.N., Wysocki, C.J. 1987. The smell survey: Results, *Natl. Geographic*, 514-525
- Graziadei, P. P. C. 1970. The mucous membranes of the nose. *Ann. Otol. Rhinol. Laryngol.* 79: 433-43.
- Graziadei, P. P. C. 1971. Topological relations between olfactory neurons. *Z. Zellforsch* 118: 449-66.
- Graziadei, P. P. C., and J. F. Metcalf. 1971. Autoradiographic and ultrastructural observations on the frog's olfactory mucosa. *Z. Zellforsch* 116: 305-18.
- Graziadei, P. P. C. 1973. Cell dynamics in the olfactory mucosa. *Tissue and Cell* 5: 113-31.
- Graziadei, P.P.C. 1978. Continuous nerve renewal in the olfactory system. In: *Handbook of Sensory Physiol.*, vol IX, Springer-Verlag, Berlin, pp 55-83.
- Graziadei, P.P.C., Karlan, M.S., Monti-Graziadei, G.A., Bernstein, J.J. 1980. Neurogenesis of sensory neurons in the primate olfactory system after section of the filia olfactoria. *Brain Res.* 186: 289-300.
- Greer, C. A., and G. M. Shepherd. 1982. Mitral cell degeneration and sensory function in the neurological mutant mouse Purkinje cell degeneration (PCD). *Brain Res.* 235: 156-61.
- Greer, C. A., W. B. Steward, J. S. Kauer, and G. M. Shepherd. 1981. Topographical and laminar localization of 2-deoxyglucose uptake in rat olfactory bulb induced by electrical stimulation of olfactory nerves. *Brain Res.* 217: 279-93.
- Griff, I. C. Reed R. R. 1995. The genetic basis for specific anosmia to isovaleric acid in the mouse. *Cell* 83: 407-14.
- Grisshammer, R. Tate C. G. 1995. Overexpression of integral membrane proteins for structural studies. *Quat. Rev. Biophys.* 28: 315-422.
- Gross-Isserof, R., D. Lancet, 1988. Concentration-dependent changes of perceived odor quality. *Chem. Senses*, 13: 191-

- 204.
- Gross-Isserof, R., Ophir, D., Bartana, A., Voet, H., Lancet, D. 1992. Evidence for genetic determination in human twins of olfactory thresholds for a standard odorant. *Neuroscience Lett.*, 141:115-8.
- Grote, J. J., W. Kuijpers, and P. L. M. Huygen. 1975. Selective denervation of the autonomic nerve supply of the nasal mucosa. *Acta Otolaryngol.* 79: 276.
- Guillot, M. 1948. Anosmies partielles et odeurs fondamentales. *C. R. Acad. Sci. Paris* 226: 1307-9.
- Guillot, M. 1948. Sur quelques caractères des phénomènes d'anosmie partielle. *C. R. Soc. Biol. Paris* 142: 161-62.
- Halasz, N., A. Ljungdahl, T. Hokfelt, O. Johanson, M. Golstein, D. Park, and P. Biberfeld. 1977. Transmitter histochemistry of the rat olfactory bulb. I immunohistochemical localization of monoamines synthesizing enzymes- Support for intrabulbar periglomerular dopamine neurons. *Brain Res.* 126: 455-74.
- Halasz, N., A. Ljungdahl, and T. Hokfelt. 1978. Transmitter histochemistry of the rat olfactory bulb. II Fluorescence, histochemical, autoradiographic and electron microscopic localization of monoamines. *Brain Res.* 154: 253-71.
- Halasz, N., and G. M. Shepherd. 1983. Neurochemistry of the vertebrate olfactory bulb. *Neuroscience* 10: 579-619.
- Hamm, H. E. 1998. The many faces of G protein signaling. *J. Biol. Chem.* 273: 669-72.
- Harding, J. W., and F. L. Margolis. 1975. Denervation in the primary olfactory pathway of mice. III Effect on enzymes of carnosine metabolism. *Brain Res.* 110: 351-60.
- Harding, J.W., Wright, J.W. 1979. Effect of intranasal irrigation with mitotic inhibitors on olfactory behavior and biochemistry in mice. *Brain Res.*, 168: 31-41.
- Harding, J., Graziadei, G.A., Margolis, F.L. 1978 Denervation in the primary olfactory pathway in mice: IV, Biochemical and morphological evidence for neuronal replacement following nerve section. *Brain Res.* 132: 11-28.
- Harding, J. W., T. V. Getchell, and F. L. Margolis. 1978. Denervation in the primary olfactory pathway of mice: V, Long term effect of intranasal ZnSO₄ irrigation on behaviour, biochemistry and morphology. *Brain Res.* 140: 271-285.
- Hazelbauer, G. L. 1988. The bacterial chemosensory system. *Can. J. Microbiol.* 34: 466-74.
- Hedlund, B., Masukawa, L.M., Shepherd, G.M., 1987 Excitable properties of olfactory receptor neurons. *J Neurosci.* 7:2338-43
- Hempstead, J. L., and J. I. Morgan. 1983. Fluorescent lectins as cell-specific markers for the rat olfactory epithelium. *Chem. Senses* 8: 107-20.
- Hempstead, J. L., and J. I. Morgan. 1985. A panel of monoclonal antibodies to the rat olfactory epithelium. *J Neurosci* 5: 438-449.
- Herve D, Rogard M., Levi-Strauss M. 1995. Molecular analysis of the multiple Golf alpha subunit mRNAs in the rat brain. *Brain Res Mol Brain Res*, 32:125-34.
- Higashijima, T. Burniert J. Ross E. M. 1990. Regulation of Gi and Go by Mastoparan, related amphiphilic peptides, and hydrophobic amines. *J. Biol. Chem.* 265: 14176-86.
- Hinds, J. W., P. L. Hinds, and N. A. McNelly. 1984. An autoradiographic study of the mouse olfactory epithelium: Evidence for long-lived receptors. *Anat. Rec* 210: 375-83.
- Hoffman, H. H. 1963. The olfactory bulb, accessory olfactory bulb and hemisphere in some Anurans. *J. Comp. Neurol.* 120: 317-68.
- Holl, A. 1973. Feinstruktur des Riechepithels von Chimera monstrosa (Holocephali). *Marine Biology* 23: 59-72.
- Holl, A. 1981. Marking of olfactory axons of fishes by intravital staining with procion brilliant yellow. *Stain Technol.* 56: 67-70.
- Holley, A., and K. B. Doving. 1977. Receptor sensitivity, acceptor distribution, convergence and neural coding in the olfactory system. In *Olfaction and Taste VI, Le Magnen, J., MacLeod, P. (Eds), IRL, Londres* pp 113-23.
- Holley, A., and P. MacLeod. 1977. Transduction et codage des informations olfactives chez les vertébrés. *J. Physiol., Paris* 73: 725-828.
- Holley, A. Sicard G. 1994. Les récepteurs olfactifs et le codage neuronal de l'odeur. *Médecine/Science* 10: 1091-98.
- Honda Z, Takano T, Hirose N, Suzuki T, Muto A, Kume S, Mikoshiba K, Itoh K, Shimizu T. 1995. Gq pathway desensitizes chemotactic receptor-induced calcium signaling via inositol trisphosphate receptor down-regulation. *J Biol Chem* 270:4840-4.
- Hopkins, A. E. 1926. The olfactory receptors in Vertebrates. *J. Comp. Neurol* 41: 253-89.
- Hornung, D. E., and M. M. Mozell. 1977. Odorant removal from the frog olfactory mucosa. *Brain Research* 128: 158-63.
- Hornung, D. E., and M. M. Mozell. 1977. Factors influencing the differential sorption of odorant molecules across the olfactory mucosa. *J. Gen. Physiol* 69: 343-61.
- Hornung, D. E., S. L. Youngentob, and M. M. Mozell. 1987. Olfactory mucosa/air partitioning of odorants. *Brain Res.* 413: 147-54.
- Hudson, R., and H. Distel. 1987. Regional autonomy in the peripheral processing of odor signals in newborn rabbits. *Brain Res.* 421: 85-94.
- Huque, T. Bruch R. C. 1986. Odorant and guanine nucleotide-stimulated phosphoinositide turnover in olfactory cilia. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 137: 36-42.
- Ingi, T. Ronnett G. V. 1995. Direct demonstration of a physiological role for carbon monoxide in olfactory receptor neurons. *J. Neurosci* 15: 8214-22.
- Ismailov AD, Sobolev AYu, Danilov VS. 1990. Bioluminescence decay kinetics in the reaction of bacterial luciferase with different aldehydes. *J Biolumin Chemilumin.* 5:213-7.
- Ivanova TT, Caprio J. 1993. Odorant receptors activated by amino acids in sensory neurons of the channel catfish *Ictalurus punctatus*. *J Gen Physiol.*, 102:1085-105.

- Jennes, L., and W. E. Stumpf. 1980. LHRH systems in the brain of the golden hamster. *Cell Tiss.Res.* 209: 239-56.
- Jones, D. T., E. Barbosa, and R. R. Reed. 1988. Expression of G-protein α subunits in rat olfactory neuroepithelium : candidates for olfactory signal transduction. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* 53: 349-54.
- Jones, D. T., and R. R. Reed. 1989. G(olf): An Olfactory neuron specific-G protein involved in odorant signal transduction. *Science* 244: 790-795.
- Jorquera, O., Latorre, R., Labarca, P. 1995. Ion channel classes in purified olfactory cilia membranes: planar lipid bilayer studies. *Am. J. Physiol.*, 269:C1325-C1244.
- Joshi, H., M. L. Getchell, B. Zielinski, and T. V. Getchell. 1987. Spectrophotometric determination of cation concentrations in olfactory mucus. *Neurosci. Letters* 82: 321-26.
- Jourdan, F. 1975. Ultrastructure de l'épithélium olfactif du rat: polymorphisme des récepteurs. *C.R. Acad. Sc., Paris* 280: 443-46.
- Jourdan, F., A. Duveau, L. Astic, and A. Holley. 1980. Spatial distribution of (14C)-2-deoxyglucose uptake in the olfactory bulbs of rat stimulated with two different odours. *Brain Research* 188: 139-54.
- Jourdan, F. 1982. Spatial dimension in olfactory coding: A representation of the 2-deoxy-glucose patterns of the glomerular labelling in the olfactory bulb. *Brain Res.*, 240: 341-344.
- Jourdan, F. 1984. Le codage spatial de l'information olfactive. Etude anatomo-fonctionnelle. *Thèse, Lyon I, Université Claude Bernard, 1984, Villeurbanne, France.*
- Juge, A., A. Holley, and J. C. Delaleu. 1979. Olfactory receptor cell activity under electrical polarization of the nasal mucosa in the frog. I Spontaneous activity. *J. Physiol. Paris* 75: 919-27.
- Juge, A., A. Holley, and D. Rajon. 1979. Olfactory receptor cell activity under electrical polarization of the nasal mucosa in the frog. II Responses to odour stimulation. *J. Physiol. Paris* 75: 929-38.
- Juifls DM, Fulle HJ, Zhao AZ, Houslay MD, Garbers DL, Beavo JA 1997. A subset of olfactory neurons that selectively express cGMP-stimulated phosphodiesterase (PDE2) and guanylyl cyclase-D define a unique olfactory signal transduction pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:3388-95.
- Kaissling, K. E. 1996. Peripheral mechanisms of pheromone reception in moths. *Chem. Senses* 21: 257-68.
- Kanaki, K. Kawashima S. Kashiwayanagi M. Kurihara K. 1997. Carnosine-induced inward currents in rat olfactory bulb neurons in cultured slices. *Neurosci. Letters* 231: 167-70.
- Kang J, Caprio J 1997. In vivo responses of single olfactory receptor neurons of channel catfish to binary mixtures of amino acids. *J Neurophysiol.*, 77:1-8
- Kashiwayanagi, M., A. Suenaga, S. Enomoto, and E. Kurihara. 1990. Membrane Fluidity Changes of liposomes in response to various odorants. Complexity of membrane composition and variety of adsorption sites for odorants. *Biophys. J.* 58: 887-95.
- Kashiwayanagi M, Kawahara H, Hanada T, Kurihara K 1994. A large contribution of a cyclic AMP-independent pathway to turtle olfactory transduction. *Gen Physiol.*, 103:957-74
- Kashiwayanagi, M. Kurihara K. 1996. Specific receptor- and non-receptor-mediated odor responses and their multiple transduction pathways. *Prim. Sensory Neuron.* 1: 311-25.
- Kauer, J. S. 1974. Response patterns of amphibian olfactory bulb neurons to odour stimulation. *J. Physiol. (London)* 243: 695-715.
- Kauer, J. S. 1987. Coding in the olfactory system. In: *Neurobiology of Taste and Smell, T.E. Finger (Ed) Jons Willey & sons*, pp. 205-31.
- Kaupp, U. B. 1991. The cyclic nucleotide-gated channels of vertebrate photoreceptors and olfactory epithelium. *TINS* 14: 150-157.
- Keller, A. Yagodin S. Aroniadou-Anderjaska V. Zimmer L. A. Ennis M. Sheppard N. F. Jr Shipley M. T. 1998. Functional organization of rat olfactory bulb glomeruli revealed by optical imaging. *J. Neurosci.* 18: 2602-12.
- Kennedy C, Des Rosiers MH, Jehle JW, Reivich M, Sharpe F, Sokoloff L 1975. Mapping of functional neural pathways by autoradiographic survey of local metabolic rate with (14C)deoxyglucose. *Science*, 187:850-3.
- Kent, P. F., S. L. Youngentob, P. R. Sheehe 1995. Odorant-specific patterns in mucosal activity predict perceptual differences among odorants. *J. Neurophysiol.* 74: 1777-81.
- Kerjaschki D., H. Horandner 1976. The development of the mouse olfactory vesicles and their cell contacts: A freeze-etching study. *J. Ultrastruct. Res.* 54: 420-444.
- Keverne E.B., 1998. Vomeronasal/accessory olfactory system and pheromonal recognition. *Chem. Senses* 23:491-4
- Key, B., and P. P. Giorgi. 1986. Selective binding of soybean agglutinin to the olfactory system of *Xenopus*. *Neurosci* 18: 507-15.
- Key, B., and P. P. Giorgi. 1986. Soybean agglutinin binding to the olfactory systems of rat and mouse. *Neurosci. Letters*, 69:131-36.
- Kiefer, H. Krieger J. Olszewski J. D. von Heijne G. Prestwich G. D. Breer H. 1996. Expression of an olfactory receptor in *Escherichia coli*: Purification, reconstitution and ligand binding. *Biochemistry* 35: 16077-84.
- Kleene, S. J. 1993. Origin of the Chloride current in olfactory transduction. *Neuron* 11: 123-32.
- Kleene, S. J., and R. C. Gesteland. 1991. Calcium-activated chloride conductance in frog olfactory cilia. *J. Neurosci.* 11:3624-29.
- Körschen, H. G. Illing M. Seifert R. Sesti F. Williams A. Gotzes S. Colville C. Müller F. Dosé A. Godde M. Molday L. Kaupp U. B. 1995. A 240 kDa protein represents the complete subunit of the cyclic nucleotide-gated channel from rod photoreceptors. *Neuron* 15: 627-36.
- Koster, E. P. 1971. Adaptation and cross adaptation in olfaction. *Thesis, Bronder Offset N.V., Rotterdam.*
- Kristensson, K. Olsson Y. 1971. Uptake of exogenous proteins in mouse olfactory cells. *Acta Neuropath* 19: 145-54.
- Kroner C., Boekhoff I. Lohmann S. M. Genieser H-G. Breer H. 1996. Regulation of olfactory signalling via cGMP-dependent protein kinase. *Eur. J. Biochem.* 236: 632-37.

- Kubick, S. Strotmann, Andréini I Breer H. 1997. Subfamily of olfactory receptors characterized by unique structural features and expression patterns. *J. Neurochem.* 69: 465-75.
- Kubie, J., A. Mackay-Sim, and D. G. Moulton. 1980. Inherent spatial patterning of responses to odorants in the salamander olfactory epithelium. In *Olfaction and Taste VII*, H. Van der Starre ed., IRL Press, London, pp. 163-66.
- Kuby, S. A. 1991. A study of enzymes. *Volume I, Enzyme Catalysis, Kinetics, and Substrate Binding*, CRC Press, Boston.
- Kurahashi, T. 1989. Activation by odorants of cation-selective conductance in the olfactory receptor cell isolated from the newt. *J. Physiology* 419: 177-92.
- Kurahashi T, Shibuya T 1990. Ca²⁺(+)-dependent adaptive properties in the solitary olfactory receptor cell of the newt. *Brain Res.*, 515:261-8.
- Kurahashi, T. Kaneko A. 1991. High density cAMP-gated channels at the ciliary membrane in the olfactory receptor cell. *Neuroreport* 2: 5-8.
- Kurahashi, T., and K. W. Yau. 1993. Co-existence of cationic and chloride components in odorant-induced current of vertebrate olfactory receptor cells. *Nature* 363: 71-74.
- Labarca, P., S. A. Simon, and R. R. H. Anholt. 1988. Activation by odorants of multistate cation channel from olfactory cilia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 944-47.
- Lafay, F., Coulon, P., Astic, L., Saucier, D., Riche, D., Holley, A., Flamand, A. 1991. Spread of the CVS strain of rabies virus and of the avirulent mutant AvO1 along the olfactory pathways of the mouse after intranasal inoculation. *Virology*, 183:320-330.
- Lancet, D., C. A. Greer, J. S. Kauer, and G. M. Shepherd. 1982. Mapping of odor-related neuronal activity in the olfactory bulbs by high-resolution 2-deoxyglucose autoradiography. *Proc. Natl. Acad. Sci* 79: 70-674.
- Lancet, D., and N. Ben-Arie. 1993. Olfactory receptors. *Current Biol.* 3: 668-74.
- Land, L. J., R. P. Eager, and G. M. Shepherd. 1970. Olfactory nerve projections to the olfactory bulb in rabbit: demonstration by means of a simplified ammoniacal silver degeneration method. *Brain Res.* 23: 250-54.
- Land, L. J. 1973. Localized projection of olfactory neurons to the rabbit olfactory bulb. *Brain Res.* 63: 153-166.
- Land, L. J., and G. M. Shepherd. 1974. Autoradiographic analysis of olfactory receptor projections in the rabbit. *Brain Res.* 70: 506-510.
- Lawless HT, Thomas CJ, Johnston M. 1995. Variation in odor thresholds for l-carvone and cineole and correlations with suprathreshold intensity ratings. *Chem Senses* 20:9-17.
- Le Gros Clark, W. E. 1951. The projection of the olfactory epithelium on the olfactory bulb in the rabbit. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiat.* 14: 1-10.
- Le Gros Clark, W. E. 1956. Observations on the structure and organization of olfactory receptors in the rabbit. *J. Biol. Med.* 29: 83-95.
- Lee, K. H., R. G. Wells, and R. R. Reed. 1987. Isolation of an olfactory cDNA: similarity to retinol-binding protein suggests a role in olfaction. *Science* 235: 1053-56.
- Leibovici, M. Lapointe F. Aletta P. Ayer-Le-Lièvre C. 1996. Avian olfactory receptors: differentiation of olfactory neurons under normal and experimental conditions. *Develop. Biol.* 175: 118-31.
- Leinders-Zufall, T. Shepherd G. M. Zufall F. 1996. Modulation by cyclic GMP of the odour sensitivity of vertebrate olfactory receptor cells. *Proc. R. Soc. Lond., B* 263: 803-11.
- Lengeler, J. 1975. Mutations affecting transport of the hexitols D-mannitol, D-glucitol- and D-galactitol in *Escherichia coli* K-12: Isolation and mapping. *J. Bacteriol.* 124: 26-38.
- Lerner, M. R. Reagan J. Gyorgyi T. Roby A. 1988. Olfaction by melanophores: What does it mean? *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* 85: 261-64.
- Levetau, J., and P. MacLeod. 1966. Olfactory discrimination in the rabbit olfactory glomerulus. *Science* 153: 175-176.
- Levin, H. S., W.M. High, and H. M. Eisenberg. 1985. Impairment of olfactory recognition after closed head injury. *Brain* 108: 579-91.
- Levy, N. S., H. A. Bakalyar, and R. R. Reed. 1991. Signal transduction in olfactory neurons. *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.* 39: 633-37.
- Lidow, M. S., B.P.M. Menco. 1984. Observations on axonemes and membranes of olfactory and respiratory cilia in frogs and rats using tannic acid-supplemented fixation and photographic rotation. *J. Ultrastruct. Res.*, 86: 18-30.
- Lidow, M.S., S.J. Kleene, and R. C. Gesteland. 1986. Suppression of mitotic activity and synchronisation of cell development in olfactory epithelium. *Dev. Brain Res.* 28: 145-62.
- Lidow, M.S., R.C. Gesteland, M. T. Shippley, and S. J. Kleene. 1987. Comparative study of immature and mature olfactory receptor cells in adult frogs. *Dev. Brain Res.* 31: 243-58.
- Liman, E. R. and L.B. Buck 1994. A second subunit of the olfactory cyclic nucleotide-gated channel confers high sensitivity to cAMP. *Neuron* 13: 611-21.
- Liu M, Chen TY, Ahamed B, Li J, Yau KW 1994 Calcium-calmodulin modulation of the olfactory cyclic nucleotide-gated cation channel. *Science*, 266: 1348-54.
- Liu, D.T. , G.R. Tibbs, S.A. Siegelbaum 1996. Subunit stoichiometry of cyclic nucleotide-gated channels and effects of subunit order on channel function. *Neuron* 16: 983-90.
- Löbel, D., Marchese S. Krieger J. Pelosi P. Breer H. 1998. Subtypes of odorant-binding proteins. Heterologous expression and ligand binding. *Eur. J. Biochem.* 254: 318-24.
- Lowe, G., G.H. Gold. 1993a. Contribution of the ciliary cyclic nucleotide-gated conductance to olfactory transduction in the salamander. *J. Physiol. London* 462: 175-96.
- Lowe, G., G.H. Gold. 1993b. Nonlinear amplification by calcium-dependent chloride channels in olfactory receptor cells. *Nature* 366: 283-86.

- Lu, X.C.M., Slotnick B.M. 1994. Recognition of propionic acid vapor after removal of the olfactory bulb area associated with high 2-DG uptake. *Brain Res.* 639: 26-32.
- Lu, X.C.M., Slotnick B.M. 1998. Olfaction in rats with extensive lesions of the olfactory bulbs: Implications for odor coding. *Neuroscience* 84: 849-66.
- Lucero MT, Chen N 1997. Characterization of voltage- and Ca(2+)-activated K⁺ channels in squid olfactory receptor neurons. *J Exp Biol* 200:1571-86.
- Ludwig, J., T. Margalit, E. Eismann, D. Lancet, and U. B. Kaupp. 1990. Primary structure of c-AMP gated channel from bovine olfactory epithelium. *FEBS Lett.* 270: 24-29.
- Lynch J.W., Barry P.H., 1991 Inward rectification in rat olfactory receptor neurons. *Proc. Royal Soc. London Series B-Biol. Sci.*, 1991, 243:149-53.
- Ma, L. and Michel W.C. 1998. Drugs affecting phospholipases C - mediated signal transduction block olfactory cyclic nucleotide-gated current of adult zebrafish. *J. Neurophysiol.* 79: 1183-92.
- MacLeod, N. K., and D. W. Straughan. 1979. Responses of olfactory bulb neurons to the dipeptide carnosine. *Exp. Brain Res.* 34: 183-88.
- Mackay-Sim, A., and U. Patel. 1984. Regional differences in cell density and cell genesis in the olfactory epithelium of the salamander, *Ambystoma tigrinum*. *Exp. Brain Res.* 57: 99-106.
- Mackay-Sim, A., P. Shaman, and D. G. Moulton. 1982. Topographic coding of olfactory quality : odorant specific patterns of epithelial responsivity in the salamander. *J. Neurophysiol.* 48: 584-96.
- Macrides, F. Davis B. J. 1983. The olfactory bulb. In: Chemical Neuroanatomy, P.C., Emson ed., Raven Press, N.Y., pp. 391-426.
- Macrides, F., T. A. Schoenfeld, J. E. Marchand, and A. N. Clancy. 1985. Evidence for morphological neurochemically and functionally heterogeneous classes of mitral and tufted cells in the olfactory bulb. *Chem. Senses* 10: 175-202.
- Mair, R. G., R. C. Gesteland, and D. L. Blank. 1982. Changes in morphology and physiology of olfactory receptor cilia during development. *Neuroscience* 7: 3091-103.
- Mania-Farnell, B., and A. I. Farbman. 1990. Immunohistochemical Localization of Guanine Nucleotide-Binding Proteins in Rat Olfactory Epithelium During Development. *Dev. Brain Res.* 51: 103-12.
- Marin-Padilla, M., and M. R. Amieva. 1989. Early Neurogenesis of the Mouse Olfactory Nerve: Golgi and Electron Microscopic Studies. *J. Comp. Neurol.* 288: 339-52.
- Marullo, S. Bertin B. Freissmuth M. Strosberg A. D. 1992. Quand les bactéries nous montrent comment fonctionnent les récepteurs humains. *Médecine/Science* 6: 577-83.
- Matulionis, D.H. 1975. Ultrastructural study of mouse epithelium following destruction by ZnSO₄ and its subsequent regeneration. *Am. J. Anat.*, 142:67-90.
- Mason, R. J., and W. L. Silver. 1983. Trigeminally mediated odor aversions in starlings. *Brain Res.* 269: 196-99.
- Mason, R. J., and T. H. Morton. 1984. Fast and loose covalent binding of ketones as a molecular mechanism in vertebrate olfactory receptors. Chemical production of selective anosmia. *Tetrahedron* 40: 483-92.
- Mason, J. R., L. Clark, and T. H. Morton. 1984. Selective deficits in the sense of smell caused by chemical modification of the olfactory epithelium. *Science* 226: 1092-94.
- Masson, C., S. Kouprach, I. Giachetti, and P. MacLeod. 1978. Relation between intramembranous particle density of frog olfactory cilia and EOG response. In : *Olfaction and Taste VI (Le Magnen J. Et MacLeod P., Eds)*, IRL Press, Londres, pp195.
- Masukawa, L. M., B. Hedlund, and G. M. Shepherd. 1985. Electrophysiological properties of identified cells in the in vitro olfactory epithelium of the Tiger salamander. *J. Neurosci.* 5: 128-35.
- Maue, R. A., and V. E. Dionne. 1987. Patch-clamp studies of isolated mouse olfactory receptor neurons. *J. Gen. Physiol* 90: 95-125.
- Meisami, E., and L. Safari. 1981. A quantitative study of the effects of early unilateral olfactory deprivation on the number and distribution of mitral and tufted cells and of glomeruli in the rat olfactory bulb. *Brain Res.* 221: 81-107.
- Meisami, E. 1989. A proposed relationship between increases in the number of olfactory receptor neurons, convergence ratio and sensitivity in the developing rat. *Dev. Brain Research.* 46: 9-19.
- Menco, B.P.M., G. Dodd, M. Davey, and L. H. Bannister. 1976. Presence of membrane particles in freeze- etched bovine olfactory cilia. *Nature* 263: 597-99.
- Menco, B. P. M. 1980. Qualitative and quantitative freeze-fracture studies on olfactory and nasal respiratory epithelial surfaces of frog, ox, rat and dog. II- Cell apices, cilia and microvilli. *Cell. Tiss. Res.* 211: 2-29.
- Menco, B.P.M. 1980. Qualitative and quantitative freeze-fracture studies on olfactory and respiratory epithelial surfaces of frog, ox, rat, and dog. IV. Ciliogenesis and ciliary necklaces (including high-voltage observations). *Cell Tissue Res* 1980;212:1-16.
- Menco, B.P.M. Farbman A. I. 1985. Genesis of cilia and microvilli of nasal epithelia during pre-natal development. I- Olfactory epithelium, qualitative studies. *J. Cell Sci.* 78: 283-310.
- Menco, B.P.M., and A. I. Farbman. 1985. Genesis of cilia and microvilli of the rat nasal epithelia during pre-natal development. II olfactory epithelium, a morphometric analysis. *J. Cell Sci.* 78: 311-36.
- Menco, B.P.M., and A. I. Farbman. 1992. Ultrastructural evidence for multiple mucous domains in frog olfactory epithelium. *Cell. Tiss. Res.* 270: 47-56.
- Menco, B.P.M., Bruch R. C. Dau B. Danho W. 1992. Ultrastructural localization of olfactory transduction components: The G protein subunit Golf α and type III adenylyl cyclase. *Neuron* 8: 441-53.
- Menco, B.P.M. Tekula F. D. Farbman A. I. Danho W. 1994. Developmental expression of G-proteins and adenylyl cyclase in peripheral olfactory systems. Light microscopic and freeze-substitution electron microscopic

- immunocytochemistry. *J Neurocytol.* 23: 708-27.
- Menco, B.P.M. Cunningham A. M. Qasba P. Levy N. Reed R. R. 1997. Putative odour receptors localize in cilia of olfactory receptor cells in rat and mouse: a freeze-substitution ultrastructural study. *J. Neurocytol.* 26: 691-706.
- Menevse, A., G. H. Dodd, and T. M. Poynder. 1978. A chemical modification approach to the olfactory code. Studies with a thiol-specific reagent. *Biochem. J* 176: 845-54.
- Meredith, M., and R. J. O'Connel. 1988. HRP uptake by olfactory and vomeronasal receptor neurons: use as indicator of uncomplete lesions and relevance for non-volatile chemoreception. *Chem. Senses* 13: 487-515.
- Metzger, T.G. Ferguson D.M. 1995. On the role of extracellular loops of opioid receptors in conferring ligand selectivity. *FEBS Letters* 375: 1-4.
- Michel WC, Ache BW. 1994. Odor-evoked inhibition in primary olfactory receptor neurons. *Chem Senses*, 19:11-24.
- 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., J.A. Ayres, L. L. Calhoun, J. T. Young, and M. J. McKenna. 1981. Comparative short-term inhalation toxicity of ethylene glycol monomethyl ether and propylene glycol monomethyl ether in rats and mice. *Toxicol. Appl. Pharmacol* 61: 68-377.
- Miller, R.R. Ayres J. A., G. C. Jersey, and M. J. McKenna. 1981. Inhalation toxicity of acrylic acid. *Fundam. Appl. Toxicol* 1: 71-277.
- Miller, R.R., E.A. Hermann, J. T. Young, L. L. Calhoun, and P. E. Kastl. 1984. Propylene glycol monomethyl ether acetate (PGMEA) metabolism, disposition and short-term vapor inhalation toxicity studies. *Toxicol. Appl. Pharmacol* 75: 21-530.
- Minami, M. Onogi T. Nakagawa T. Katao Y. Aoki Y. Katsumata S. Satoh M. 1995. DAMGO, a μ -opioid receptor selective ligand, distinguishes between μ - and κ -opioid receptors at a different region from that for the distinction between μ - and δ -opioid receptors. *FEBS Letters* 364: 23-27.
- Minor, A. V., and N. L. Sakina. 1973. Role of cyclic adenosine 3'-5' monophosphate in olfactory reception. *Neurofisiologia* 5: 415-22.
- Morales, J.A., Herzog, S., Kompter, C., Frese, K., Rott, R. 1988 Axonal transport of borna disease virus along olfactory pathways in spontaneously and experimentally infected rats. *Med. Microbiol. Immunol.* 177: 51-68.
- Moran DT, Varela FJ, Rowley JC. 1977. Evidence for active role of cilia in sensory transduction. *Proc Natl Acad Sci USA.* 74:793-7.
- Moran DT, Jafek BW, Rowley JC III, Eller PM 1985 Electron microscopy of olfactory epithelia in two patients with anosmia. *Arch Otolaryngol.* 111:122-6.
- Morgan, K. T., D. L. Patterson, and E. A. Gross. 1986. Responses of the nasal mucociliary apparatus of F-344 rats to formaldehyde gas. *Toxicol. Appl. Pharmacol* 82: -13.
- Mori, K., K. Kishi, and H. Ojima. 1983. Distribution of dendrites of mitral, displaced mitral, tufted, and granule cells in the rabbit olfactory bulb. *J. Comp. Neurol* 219: 339-55.
- Mori, K., S. C. Fujita, K. Imamura, and K. Obata. 1985. Immunohistochemical study of subclasses of olfactory nerve fibers and their projections to the olfactory bulb in the rabbit. *J. Comp. Neurol* 242: 214-29.
- Mori, K. 1987. Monoclonal antibodies (2C5 and 4C9) against lactoseries carbohydrates identify subsets of olfactory and vomeronasal receptor cells and their axons in the rabbit. *Brain Res.* 408: 215-21.
- Mori, K., and K. Onoda N. Imamura. 1990. Signal processing in the rabbit olfactory bulb. *Proceeding ISOT X.*
- Mori, K., N. Mataga, and K. Imamura. 1992. Differential specificities of single mitral cells in rabbit olfactory bulb for a homologous series of fatty acid odor molecules. *J. Neurophysiol.* 67: 786-89.
- Motokizawa, F. 1996. Odor representation and discrimination in mitral/tufted cells of the rat olfactory bulb. *Exp. Brain Res.* 112: 24-34.
- Mott, A. E. Leopold D. A. 1991. Disorders in taste and smell. *Medical Clinics of North America* 75: 1321-53.
- Moulton, D. G. 1975. Cell renewal in the olfactory epithelium of the mouse. In *Olfaction and Taste V*, Denton, D.A., Coghlan, J.P., (eds.), Academic Press, New York 1975, pp: 111-14.
- Moulton, D. G. 1976. Spatial patterning of response to odors in the peripheral olfactory system. *Physiol. Rev.* 56: 578-93.
- Mousli, M. Bronner C. Landry Y. Bockaert J. Rouot B. 1990. Direct activation of GTP-binding regulatory proteins (G-proteins) by substance P and compound 48/80. *FEBS* 259: 260-262.
- Mozell, M. M. 1964. Olfactory discrimination : electrophysical spatio temporal basis. *Science* 143: 1336-37.
- Mozell, M. M. 1966. The spatiotemporal analysis of odorants at the level of the olfactory receptor sheet. *J. Gen. Physiol.* 50:25-41.
- Mugnaini, E, W. H. Oertel, and F. F. Wouterlood. 1984. Immunocytochemical localization of GABA neurons and dopamine neurons in the rat main and accessory olfactory bulbs. *Neurosci. Letters* 47: 221-26.
- Müller, F. Bönick W. Sesti F. Frings S. 1998. Phosphorylation of mammalian olfactory cyclic nucleotide-gated channels increases ligand sensitivity. *J. Neurosci.* 18: 164-73.
- Mustaparta, H. 1971. Spatial distribution of receptor-responses to stimulation with different odours. *Acta Physiol. Scand.* 82: 154-66.
- Nakamura, T., and H. G. Gold. 1987. A cyclic nucleotide-gated conductance in olfactory receptor cilia. *Nature* 325: 442-44.
- Nef, P., J. Heldman, D. Lazard, T. Margalit, M. Jaye, I. Hanukoglu, and D. Lancet. 1989. Olfactory specific cytochrome P-450. *J. Biol. Chem* 264: 6780-6785.
- Nef, P., I. Hermans-Borgmeyer, H. Artieres-Pin, L. Beasley, V. E. Dionne, and S. F. Heinemann. 1992. Spatial pattern of receptor expression in the olfactory epithelium. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* 89: 8948-52.
- Nekrasova E, Sosinskaya A, Natochin M, Lancet D, Gat U 1996. Overexpression, solubilization and purification of rat and human olfactory receptors. *Eur J Biochem* 238:28-37.

- Ngai, J., Chess, A., Dowling, M.M., Necles, N., Macagno, E.R., Axel, R. 1993. Coding of olfactory information: topography of odorant receptor expression in the catfish olfactory epithelium. *Cell* 72:667-80.
- Ngai, J., M. M. Dowling, L. Buck, R. Axel, and A. Chess. 1993. The family of genes encoding odorant receptors in the channel catfish. *Cell* 72: 657-66.
- Odagaki, Y., Nishi N., Koyama T. 1998. Receptor-mediated and receptor-independent activation of G-proteins in rat brain membranes. *Life Sci.* 62: 1537-41.
- Ohno, T., K. Yoshii, and K. Kurihara. 1984. Multiple receptor types for amino-acids in the carp olfactory cells revealed by quantitative cross-adaptation method. *Brain Res.* 310: 13-21.
- Ohno, T., K. Yoshii, and K. Kurihara. 1985. Quantitative analysis on discrimination of various odorants at receptor sites of the frog olfactory cell revealed by a cross adaptation method. *Comp. Biochem. Physiol.* 82: 153-59.
- Okada, Y., Teeter J. H., Restrepo D. 1994. Inositol 1,4,5-triphosphate-gated conductance in isolated rat olfactory neurons. *J. Neurophysiol.* 71: 595-602.
- Okamura, H., Sugai N., Ohtani I. 1996. Identification of nasal epithelial cells with carbonic anhydrase activities. *Brain Res.* 728: 263-66.
- Okano, M., A. F. Weber, and S. P. Frommes. 1967. Electron microscopic studies of the distal border of the canine olfactory epithelium. *J. Ultrastruct. Res.* 17: 487-502.
- Okano, M., and S. F. Takagi. 1974. Secretion and electrogenesis of the supporting cell in the olfactory epithelium. *J. Physiol* 242: 353-70.
- Onogi, T., Minami M., Katao Y., Nakagawa T., Aoki Y., Toya T., Katsumata S., Satoh M. 1995. DAMGO, α -opioid receptor selective agonist, distinguishes between μ - and δ -opioid receptors around their first extracellular loops. *FEBS Lett.* 357: 93-97.
- Ophir D., Guterman A., Gross-Isseroff R. 1988. Changes in smell acuity induced by radiation exposure of the olfactory mucosa. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.*, 114:853-5.
- Orona, E., E. C. Rainer, and J. W. Scott. 1984. Dendritic and axonal organization of mitral and tufted cells in the rat olfactory bulb. *J. Comp. Neurol.* 226: 346-56.
- Ottoson, D. 1956. Analysis of the electrical activity of the olfactory epithelium. *Acta Physiol. Scand.*, 35 suppl. 22: 1-83.
- Ottoson, D., and G. M. Shepherd. 1967. Experiments and concepts in olfactory physiology. In: *Progress in Brain Research*, n. 23, Y.Z. Zotterman (ed), Elsevier, New York, pp: 83-138.
- Pace, U., E. Hanski, Y. Salomon, and D. Lancet. 1985. Odorant-sensitive adenylate cyclase may mediate olfactory reception. *Nature* 316: 255-58.
- Pager, J., I. Giachetti, A. Holley, and J. Le Magnen. 1972. A selective control of olfactory bulb electrical activity in relation to food deprivation and satiety in rats. *Physiol. Behav.* 9: 573-79.
- Palminero, C.C., Rusiniak, K.W., Garcia, J. 1980. Flavor-illness aversions: The roles of odor and taste in memory for poison. *Science*, 208:753-5.
- Papka, R. E., and D. M. Matulonis. 1983. Association of substance P-immunoreactive nerves with the murine olfactory mucosa. *Cell. Tiss. Res.* 230: 517-26.
- Parmentier, M., F. Libert, S. Schurmans, S. Schiffmann, A. Lefort, D. Eggerickx, C. Ledent, C. Mollereau, C. Gérard, J. Peret, A. Grootegeod, and G. Vassart. 1992. Expression of members of the putative olfactory receptor gene family in mammalian germ cells. *Nature* 355: 453-55.
- Patterson, P.M., Lauder, B.A. 1949. The incidence and probable inheritance of "smell blindness". *J. Heredit.* 39: 295-7.
- Pedersen, P. E., P. J. Jastreboff, W. B. Stewart, and G. M. Shepherd. 1986. Mapping of an olfactory receptor population that projects to a specific region in the rat olfactory bulb. *J. Comp. Neurol* 250: 93-108.
- Pelosi, P. 1978. Specific anosmia to l-carvone the minty primary odour. *2nd ECRO Congress Univ. Reading, UK* 3, no. 8: 331-37.
- Pelosi, P., and A. M. Pisanelli. 1981. Specific anosmia to 1-8 cineole : the camphor primary odor. *Chem. Senses* 6: 87-93.
- Pelosi, P., A. M. Pisanelli, N. E. Baldaccini, and A. Cagliordo. 1981. Binding of 3H-2-isobutyl-3-methoxy pyrazine to cow olfactory mucosa. *Chem. Senses* 6: 77-85.
- Pelosi, P., N. E. Baldaccini, and A. M. Pisanelli. 1982. Identification of a specific olfactory receptor for 2-isobutyl-3-methoxypyrazine. *Biochem. J* 201: 245-48.
- Pelosi, P. 1994. Odorant-binding Proteins. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 29: 199-228.
- Pelosi, P., Maida, R., 1995. The physiological functions of odorant-binding proteins. *Biophysics*, 40: 143-51.
- Pes, D., Mameli M., Andreini I., Krieger J., Weber M., Breer H., Pelosi P. 1998. Cloning and expression of odorant-binding proteins Ia and Ib from mouse nasal tissue. *Gene* 212: 49-55.
- Pevsner, J., P.B. Sklar, and S. H. Snyder. 1986. Odorant binding protein: localization to nasal glands and secretions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83: 4942.
- Pevsner, J., P.M. Hwang, P. B. Sklar, J. C. Venable, and S. H. Snyder. 1988. Odorant-binding protein and its mRNA are localized to lateral nasal gland implying a carrier function. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* 85: 2383-87.
- Pixley, S.K. 1992. CNS glial cells support in vitro survival, division and differentiation of dissociated olfactory neuronal progenitor cells. *Neuron* 8, no. 1191-1204.
- Pixley, S.K., Farbman, A.I., Menco, B.P.M. 1997. Monoclonal antibody marker for olfactory sustentacular cell microvilli. *Anat. Rec.*, 248:307-21.
- Pourtier, L., Sicard G. 1990. Comparison of the sensitivity of C57BL/6J AND AKR/J mice to airborne molecules of isovaleric acid and amyl acetate. *Behav. Genet.* 20: 499-501.
- Price, S. 1978. Anisole binding protein from dog olfactory epithelium. *Chem. Senses and Flavour*, 3: 51-557.
- Prigogine I., Stengers, I. 1979. *La nouvelle alliance*. Gallimard.
- Rafols, J. A., and T. V. Getchell. 1983. Morphological relation between the receptor neurons, sustentacular cells and

- Schwann cells in the olfactory mucosa of the salamander. *Anat. Rec* 206: 87-101.
- Raming, K. Krieger J. Strotmann J. Boekhoff I. Kubick S. Baumstark C. Breer H. 1993. Cloning and expression of odorant receptors. *Nature* 361: 353-61.
- Ramon-Cueto A, GW Plant, J Avila, MB Bunge 1998. Long-distance axonal regeneration in the transected adult rat spinal cord is promoted by olfactory ensheathing glia transplants. *J Neurosci* 18:3803-15.
- Ramon-Cueto, A., J. Perez, and M. Nieto-Sampedro. 1993. In vitro enfolded of olfactory neurites by p75 NGF receptor positive ensheathing cells from adult rat olfactory bulb. *European, J. Neurosci.* 5: 1172-80.
- Ramon Y Caral, S. 1955. *Histologie du système nerveux de l'Homme et des Vertébrés*. Tome II. Traduction française: Azoulay, L., Consejo superior de investigaciones científicas, Instituto Ramon y Cajal, Madrid.
- Rawson, N. E., J. G. Brand, B. J. Cowart, L. D. Lowry, E. A. Pribitkin, V. M. Rao, and D. Restrepo. 1995. Functionally mature olfactory neurons from two anosmic patients with kallman syndrome. *Brain Res.* 681: 58-64.
- Reed, C. J., Lock.A., and F. De Matteis. 1986. NADPH: cytochrome P450 reductase in olfactory epithelium. Relevance to cytochrome P-450-dependent reactions. *Biochem. J* 240: 585-92.
- Reese, T. S. 1965. Olfactory cilia in the frog. *J. Cell Biol.* 25: 209-30.
- Reese, T. S., and M. W. Brightman 1970. Olfactory surface and central olfactory connections in some vertebrates. In: *Taste and Smell in Vertebrates, A Ciba Foundation Symposium, G.E.W. Wolstenholme, J. Knight eds, Churchill, London*, pp: 115-149.
- Ressler, K.J., S. L. Sullivan, and L. B. Buck. 1993. A zonal organization of odorant receptor gene expression in the olfactory epithelium. *Cell* 73: 597-609.
- Ressler, K.J., S. L. Sullivan, and L. Buck. 1994. Information coding in the olfactory system. Evidence for a stereotyped and highly organized epitope map in the olfactory bulb. *Cell* 79: 1245-55.
- Restrepo, D. Miyamoto T. Bryant B. P. Teeter J. H. 1990. Odor stimuli trigger influx of calcium into olfactory neurons of channel fish. *Science* 249: 1166-68.
- Restrepo, D., J. H. Teeter, E. Honda, A. G. Boyle, J. F. Marecek, G. D. Prestwich, and D. L. Kalinoski. 1992. Evidence for an InsP3-gated channel protein in isolated rat olfactory cilia. *Am. J. Physiol.* 263: C667-C673.
- Restrepo, D., Y. Okada, and J. H. Teeter. 1993. Odorant-regulated Ca²⁺ gradients in rat olfactory neurons. *J. Gen. Physiol.* 102: 907-24.
- Revial, M.F., Duchamp, A., Holley, A. 1978a. Odour discrimination by frog olfactory receptors: a second study. *Chem. Senses*, 3: 7-21.
- Revial, M.F., Duchamp, A., Holley, A. MacLeod, P. 1978b. Frog olfaction: odour groups, receptor distribution and receptor categories. *Chem. Senses* 3:23-33.
- Revial, M.F. Sicard G. Duchamp A. Holley A. 1982. New studies on odour discrimination in the frog's olfactory receptor cells. I- Experimental results. *Chem. Senses* 7: 75-190.
- Revial, M.F. Sicard G. Duchamp A. Holley A. 1983. New studies on odour discrimination in the frog's olfactory receptor cells. II Mathematical analysis of electrophysiological responses. *Chem. Senses* 8: 79-184.
- Revusky, S., Parker, L.A., Coombes, J., Coombes, S. 1977. Flavor aversion learning: Extinction of the aversion to an interfering flavor after conditioning does not affect the aversion to the reference flavor. *Behav. Biol.*, 19:171-88.
- Rhein, L. D., and R. H. Cagan. 1983. Biochemical studies of olfaction : binding specificity of odorants to cilia preparation from rainbow trout olfactory rosettes. *J. Neurochem.* 41: 569-77.
- Ring, G. Mezza R. C. Schwob J. E. 1997. Immuno-histochemical identification of discrete subsets of rat olfactory neurons and the glomeruli that they innervate. *J. Comp. Neurol.* 388: 415-34.
- Risser, J. M. Slotnick B. M. 1987. Suckling behavior in rat pups with lesions which destroy the modified glomerular complex. *Brain Res. Bull.* 19: 275-81.
- Rochel, S., and F. L. Margolis. 1982. Carnosine release from olfactory bulb synaptosomes is calcium dependent and depolarization stimulated. *J. Neurochem.* 38: 1505-14.
- Roudnitska, E. 1980, Le Parfum, Presse Universitaire de France, Paris.
- Rouquier, S. Taviaux S. Trask B. J. Brand-Arpon V. van den Engh G. Demaille J. Giorgi D. 1998. Distribution of olfactory genes in the human genome. *Nature Gen.* 18: 243-50.
- Rowley, J. C., D. T. Moran, and B. W. Jafek. 1989. Peroxidase backfills suggest the mammalian olfactory epithelium contains a 2nd morphologically distinct class of bipolar sensory neuron - The microvillar cell. *Brain Res.* 502, no. 2: 387-400.
- Royet, J. P. Sicard G. Souchier C. Jourdan F. 1987. Specificity of spatial patterns of glomerular activation in the mouse olfactory bulb: computer-assisted image analysis of 2deoxyglucose autoradiograms. *Brain Res.* 417: 1-11.
- Royet JP, Souchier C, Jourdan F, Ploye H 1988. Morphometric study of the glomerular population in the mouse olfactory bulb: numerical density and size distribution along the rostrocaudal axis. *J. Comp Neurol.* 270:559-68.
- Rusiniak, K.W., Hankins, W.G., Garcia, J., Brett, L.P. 1979. Flavor-illness aversions: Potentiation of odors by taste in rats. *Behav; Neur. Biol.*, 25:1-17.
- Sarthy, P. V., and B. S. Hilbush. 1983. Lucifer Yellow uptake in developing rat retina: Staining of horizontal cells. *Dev. Brain Res.* 11: 275-280.
- Sassoè-Pognetto, M., D. Cantino, P. Panzanelli, L. Verdun di Cantogno, M. Giustetto, F. L. Margolis, S. De Biasi, and A. Fasolo. 1993. Presynaptic co-localization of carnosine and glutamate in olfactory neurones. *NeuroReport* 5: 7-10.
- Sato T, Hirono J, Tonoike M, Takebayashi M 1994. Tuning specificities to aliphatic odorants in mouse olfactory receptor neurons and their local distribution. *J Neurophysiol* 72:2980-9
- Saucier, D., and L. Astic. 1986. Analysis of the topographical organization of olfactory epithelium projections in the rat. *Brain Res. Bull* 16: 455-62.

- Scalfari, F. Castagna M. Fattori B. Andreini I. Maremmani C. Pelosi P. 1997. Expression of a lipocalin in human nasal mucosa. *Comp. Biochem. Physiol.* 118B: 819-24.
- Schild D 1989. Whole-cell currents in olfactory receptor cells of *Xenopus laevis*. *Exp Brain Res* 78:223-32.
- Schild, D. Lischka F. W. Restrepo D. 1995. InsP3 causes an increase in apical $[Ca^{2+}]_i$ by activating two distinct current components in vertebrate olfactory receptor cells. *J. Neurophysiol.* 73: 862-66.
- Schleicher, S., I. Boekhoff, J. Arriza, and Lefkowitz J. Breer H.. 1993. A beta-adrenergic receptor kinase-like enzyme is involved in olfactory signal termination. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* 90: 1420-1424.
- Schmidt C, Schmidt U, Breipohl W, Effenberger F 1984. The effect of N-methyl-formimino-methylester on the neural olfactory threshold in albino mice. *Arch Otorhinolaryngol.* 239:25-9.
- Schmued, L. C., and J. H. Fallon. 1985. Selective neuronal uptake of 4acetamino-4'isothiocyanostilbene 2-2 disulfonic acid and other related substituted stilbenes in vivo. A fluorescent whole cell technique. *Brain Res.* 346: 24-129.
- Schneider, S. P., and F. Macrides. 1978. Laminar distributions of interneurons in the main olfactory bulb of adult hamster. *Brain Res. Bull* 3: 73-82.
- Schoenfeld, T. A., J. E. Marchand, and F. Macrides. 1985. Topographic organization of tufted cell axonal projections in the Hamster main olfactory bulb: An intrabulbar associational system. *J. Comp. Neurol.* 235: 503-18.
- Schwartz GA, Crandall JE 1991. Subsets of olfactory and vomeronasal sensory epithelial cells and axons revealed by monoclonal antibodies to carbohydrate antigens. *Brain Res* 547(2):239-48.
- Schwob, J. E., and D. I. Gottlieb. 1986. The primary olfactory projection has two chemically distinct zones. *J. Neurosci* 6: 393-3404.
- Scott, J. W. 1977. A measure of extracellular unit responses to repeated stimulations applied to observations of the time course of olfactory responses. *Brain Res.* 132: 247-58.
- Scott, J. W., and T. A. Harrison. 1987. The olfactory bulb : anatomy and physiology. *Neurobiology of Taste and Smell.* T.E. Finger and W.L. Silver eds. John Wiley and sons, New York, pp: 151-78.
- Scott, J. W. Davis L. M. Shannon D. Kaplan C. 1996. Relation of chemical structure to spatial distribution of sensory responses in rat olfactory epithelium. *J. Neurophysiol.* 75: 2036-48.
- Segal NL, Brown KW, Topolski TD 1992. A twin study of odor identification and olfactory sensitivity. *Acta Genet Med Gemellol (Roma)*, 41:113-21.
- Selbie, L. A., A. Townsend-Nicholson, T. P. Iismaa, and J. Shine. 1992. Novel G protein-coupled receptors : a gene family of putative human olfactory receptor sequences. *Mol.Brain Res.* 13: 159-63.
- Selway R, Keverne EB 1990. Hippocampal lesions are without effect on olfactory memory formation in the context of pregnancy block. *Physiol. Behav.* 47:249-52
- Sengupta, P. Chou J. H. Bargmann C. I. 1996. Odr-10 encodes a seven transmembrane domain olfactory receptor required for responses to the odorant diacetyl. *Cell* 84: 899-909.
- Shepherd, G. M. 1985. The olfactory system: the uses of neural space for a non-spatial modality. In *Contemporary Sensory Neurobiology*, A.R. Liss ed., 1985, pp:99-114.
- Shibuya, T., 1964. Dissociation of olfactory neural response and mucosal potentials. *Science*, 143: 1338-40.
- Shinoda K, Ohtsuki T, Nagano M, Okumura T 1993. A possible functional necklace formed by placental antigen X-P2-immunoreactive and intensely acetylcholinesterase-reactive (PAX/IAE) glomerular complexes in the rat olfactory bulb. *Brain Res* 618:160-6.
- Shinohara, H. Kato K. Asano T. 1992. Differential localisation of G-proteins, Gi and Go, in the olfactory epithelium and the olfactory bulb of the rat. *Acta Anat.* 144: 167-71.
- Shirley, S., E. Polak, and G. Dodd. 1983. Selective inhibition of rat olfactory receptors by concanavaline A. *Biochem J.* 11: 780-781.
- Shirley, S., E. Polak, and G. H. Dodd. 1983. Chemical modification studies on rat olfactory mucosa using a thiol-specific reagent and enzymatic iodination. *Eur. J. Biochem* 132: 485-94.
- Sicard, G. Holley A. 1984. Receptor cell responses to odorants: similarities and differences among odorants. *Brain Res.* 292: 283-96.
- Sicard, G. 1985. Olfactory discrimination of structurally related molecules: Receptor cell responses to camphoraceous odorants. *Brain Res.* 326: 203-12.
- Sicard, G. 1986. Electrophysiological recordings from olfactory receptor cells in adult mice. *Brain Res.* 397: 405-408.
- Sicard, G. Royet J. P. Jourdan F. 1989. A comparative study of 2-deoxyglucose patterns of glomerular activation in the olfactory bulbs of C57BL/6J and AKR/J mice. *Brain Research* 481: 325-34.
- Sicard, G., M. Chastrette, N. Godinot 1997. Des représentations de l'espace olfactif: des récepteurs à la perception. *Intellectica*, 24:85-107.
- Sicard, L. 1935. Contribution à l'étude d'une nouvelle méthode de traitement des métrites cervicales chroniques: l'électro-coagulation. *Thèse De Médecine, Lyon.*
- Silver, W. L., and D. G. Moulton. 1982. Chemosensitivity of rat nasal trigeminal receptors. *Physiol. Behav* 28: 27-931.
- Silver, W. L., J. R. Mason, D. A. Marshall, and J. A. Maruniak. 1985. Rat trigeminal, olfactory and taste responses after capsaicin desensitization. *Brain Res.* 333: 45-54.
- Silver, W. L., A. H. Arzt, and J. R. Mason. 1988. A comparison of the discriminatory ability and sensitivity of the trigeminal and olfactory systems to chemical stimuli in the tiger salamander. *J. Comp. Physiol. A* 164: 55-66.
- Simmons, P. A., and T. V. Getchell. 1981. Physiological activity of newly differentiated olfactory receptor neurons correlated with morphological recovery from olfactory nerve section in the salamander. *J. Neurophysiol* 45: 29-549.
- Singer, M.S., and G. M. Sheperd. 1994. Molecular modeling of ligand-receptor interactions in the OR5 olfactory receptor. *NeuroReport* 5: 1297-300.
- Singer, M.S. Oliiviera L. Vriend G. Shepherd G. M. 1995. Potential ligand-binding residues in rat olfactory receptors

- identified by correlated mutation analysis. *Receptors and Channels* 3: 89-95.
- Singer, M.S. Shepherd G. M. Greer C. A. 1995. Olfactory receptors guide axons. *Nature* 377: 19-20.
- Skeen LC 1977. Odor-induced patterns of deoxyglucose consumption in the olfactory bulb of the treeshrew, *Tupaia glis*. *Brain Res.* 124:147-53.
- Sklar, P., R. R. H. Anholt, and S. H. Snyder. 1986. The odorant-sensitive adenylate cyclase of olfactory receptor cells differential stimulation by distinct classes of odorants. *J. Biol. Chem.* 261: 15538-43.
- Slotnick, B. M., H. Panhuber, G. A. Bell, and D. G. Laing. 1989. Odor-induced metabolic activity in the olfactory bulb of rats trained to detect propionic acid vapor. *Brain Res.* 500: 161-68.
- Slotnick, G. A. Bell, H Panhuber, and D. G. Laing. 1997. Detection and discrimination of propionic acid after removal of its 2-DG identified major focus in the olfactory bulb: A psychophysical analysis. *Brain Res.* 762: 89-96.
- Smart, I.H.M. 1971. Location and orientation of mitotic figures in the developing mouse olfactory epithelium. *J. Anat.* 2:543-51.
- Sokoloff L, Reivich M, Kennedy C, Des Rosiers MH, Patlak CS, Pettigrew KD, Sakurada O, Shinohara M 1977. The [¹⁴C]deoxyglucose method for the measurement of local cerebral glucose utilization: theory, procedure, and normal values in the conscious and anesthetized albino rat. *Neurochem* 28:897-916.
- Stengl, M. 1994. Inositol-triphosphate-dependent calcium currents precede cation currents in insect olfactory receptor neurons in vitro. *J. Comp. Physiol., A* 174: 187-94.
- Stewart, W.B., Kauer, J.S., Shepherd, G.M. 1979. Functional organization of rat olfactory bulb analyzed by the 2-deoxyglucose method. *J. Comp. Neurol.*, 185:715-34.
- Stone, H., B. Williams, and E. J. A. Carregal. 1968. The role of trigeminal nerve in olfaction. *Experimental Neurology* 21: 11-19.
- Stott, W. T., and M. J. McKenna. 1985. Hydrolysis of several Glycol ether acetates and acrylate esters by nasal mucosal carboxylesterase in vivo. *Fund. Appl. Toxicol* 5: 99-404.
- Strotmann, J., I. Wanner, J. Krieger, K. Raming, and H. Breer. 1992. Expression of odorant receptors in spatially restricted subsets of chemosensory neurones. *Neuroreports* 3: 1053-56.
- Strotmann, J. Wanner I. Helfrich T. Beck A. Meinken C. Kubick S. Breer H. 1994. Olfactory neurones expressing distinct odorant receptor subtypes are spatially segregated in the nasal neuroepithelium. *Cell Tissue Res.* 276: 429-38.
- Strotmann, J. Wanner I. Helfrich Breer H. 1995. Receptor expression in olfactory neurons during rat development: In situ hybridization studies. *European J. Neurosci.* 7: 492-500.
- Strotmann, J. Konzelmann S. Breer H. 1996. Laminar segregation of odorant receptor expression in the olfactory epithelium. *Cell Tissue Res.* 284: 347-54.
- Sullivan, S. L. Bohm S. Ressler K. J. Horowitz L. F. Buck L. B. 1995. Target-independent pattern specification in the olfactory epithelium. *Neuron* 15: 779-89.
- Sumner, D. 1964. Post-traumatic anosmia. *Brain*, 87: 07-120.
- Suzuki, N. 1977. Intracellular responses of Lamprey olfactory receptors to current and chemical stimulation. In : *Food intake and chemical senses*, , Tokay, Y. Katsuki, M. Sato, S.F. Takagi.(eds), Japan Scientific Soc. Press, Tokyo.
- Suzuki, N. 1978. Effects of different ionic environments on the responses of simple olfactory receptors in the lamprey. *Comp. Biochem. Physiol.*, 61: 461-7.
- Suzuki, N. 1984. Anterograde fluorescent labeling of olfactory receptor neurons by Procion and Lucifer dyes. *Brain Res.* 311: 181-85.
- Suzuki, N. 1990. Single cyclic nucleotide-activated ion channels in olfactory receptor cell soma membranes. *Neurosci. Res. Suppl.* 12, suppl.: S113-26.
- Takagi, S.F., Wyse, G.A., Kitamura, H., Ito, K. 1968. The role of sodium and potassium in the generation of the electro-olfactogram. *J. Gen. Physiol.*, 51:552-78.
- Takagi, S.F., Aoki, K. Iino, M. Yajima, T. 1969. The electropositive potential in normal and degenerating olfactory epithelium. In: *Olfaction and Taste III*, pp92-108.
- Tareilus, E. Noe J. Breer H. 1995. Calcium signaling in olfactory neurons. *Biochim. Biophys. Acta* 1269: 129-38.
- Tegoni, M. Ramoni R. Bignetti E. Spinelli S. Cambillau C. 1996. Domain swapping creates a third putative combining site in bovine odorant binding protein dimer. *Nature Structural Biology* 3: 863-67.
- Theisen, B., M. Breuker, Zeiske E., and R. Melintak. 1980. Structure and development of the olfactory organ in the garfish *Belone belone*. (L.) (Teleosteen atheriniforme). *Acta Zool. (Stockholm)* 61: 161-70.
- Thommesen, G., and K. B. Doving. 1977. Spatial distribution of EOG in the rat: A variation with odour quality. *Acta Physiol. Scand.* 99: 270-80.
- Thommesen, G. 1982. Specificity and distribution of receptor cell in the olfactory mucosa in the char (*Salmo alpinus alpinus* L.). *Acta Physiol. Scand* 115: 47-56.
- Tonosaki, K., and T. Shibuya. 1979. Action of some drugs on gecko olfactory bulb mitral cell responses to odor stimulation. *Brain Res.* 167: 180-184.
- Trask BJ, Massa H, Brand-Arpon V, Chan K, Friedman C, Nguyen OT, Eichler E, van den Engh G, Rouquier S, Shizuya H, Giorgi D 1998. Large multi-chromosomal duplications encompass many members of the olfactory receptor gene family in the human genome. *Hum Mol Genet* 7:2007-20.
- Troemel, E. R. Chou J. H. Dwyer N. D. Colbert H. A. Bargmann C. I. 1995. Divergent seven transmembrane receptors are candidate chemosensory receptors in *C. elegans*. *Cell* 83: 207-18.
- Troemel ER, Kimmel BE, Bargmann CI 1997. Reprogramming chemotaxis responses: sensory neurons define olfactory preferences in *C. Elegans*. *Cell* 91:161-9
- Troitskaya, V. T., O. S. Gladysheva, and S. N. Novikov. 1987. Specific anosmia to isovaleric acid in the peripheral part

- of the olfactory analyser in laboratory mice. *Neurofisiologia* 19: 133-35.
- Trotier, D., and P. MacLeod. 1983. Intracellular recordings from Salamander olfactory receptor cells. *Brain Res.* 268: 225-37.
- Trotier, D. 1986. A patch-clamp analysis of membrane currents in salamander olfactory receptor cells. *Pflüger Arch.*, 407:589-95.
- Trotier, D. MacLeod P. 1986. Intracellular recordings from salamander olfactory supporting cells. *Brain Res.* 374: 205-11.
- Tucker, D., Shibuya, T. 1965. A physiologic and a pharmacologic study of olfactory receptors. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 30:207-215.
- Tucker, D. 1971. Non-olfactory responses from the nasal cavity : Jacobson 's organ and the trigeminal system. in *Handbook of Sensory Physiology*, IV Cxhemical Senses 1, Springer Verlag, New York, pp:151-81.
- Van Drongelen, W. 1978. Unitary recordings of near threshold responses of receptor cells in the olfactory mucosa of the frog. *J. Physiol* 277: 423-35.
- Van Drongelen, W., A. Holley, and K. B. Doving. 1978. Convergence in the olfactory system : Quantitative aspects of odour sensitivity. *J. Theoretical Biology* 71: 39-49.
- Vanderhaegen, P. Schurmans S. Vassart G. Parmentier M. 1993. Olfactory receptors are displayed on dog mature sperm cells. *J. Cell Biol.* 123: 1441-52.
- Vanderhaegen, Schurmans S. Vassart G. Parmentier M. 1997. Specific repertoire of olfactory receptor genes in the male germ cells of several mammalian species. *Genomics* 39: 239-46.
- Vassar R, Chao SK, Sitcheran R, Nunez JM, Vosshall LB, Axel R 1994. Topographic organization of sensory projections to the olfactory bulb. *Cell* 79:981-91.
- Verma, A. Hirsch D. J. Glatt C. E. Ronnett G. V. Snyder S. H. 1993. Carbon monoxide: a putative neural messenger. *Science* 259: 381-84.
- Vinnikov, Y. A. 1982. Chemosensory cells (olfactory and taste cells). In: Evolution of receptor cells. Cytological, membraneous and molecular levels. Springer, G.F. and Wittermann, H.G, eds, Springer-Verlag, 1982, Berlin, pp: 29-58.
- Vodyanov, V. Murphy, R.B. 1983. Single channel fluctuations in bimolecular lipid membranes induced by rat olfactory epithelium homogenates. *Science*, 220: 717-719.
- Vogt, R. G., and L. M. Riddiford. 1981. Pheromone binding and inactivation by moth antennae. *Nature* 293: 161-63.
- Walensky LD, Roskams AJ, Lefkowitz RJ, Snyder SH, Ronnett GV 1995. Odorant receptors and desensitization proteins colocalize in mammalian sperm. *Mol Med* 1:130-41.
- Walker, J. C., D. Tucker, and J. C. Smith. 1979. Odor sensitivity mediated by the trigeminal nerve in the pigeon. *Chem. Senses Flavours*, 4: 107-116.
- Wang, HW., C. J. Wysocki, and G. H. Gold. 1993. Induction of olfactory receptor sensitivity in mice. *Science* 260: 998-1000.
- Wang, F. Nemes A. Medelson M. Axel R. 1998. Odorant receptors govern the formation of a precise topographic map. *Cell* 93: 47-60.
- Weidner, C., D. Micelli, and J. Reperant. 1983. Orthograde axonal and transcellular transport of different fluorescent tracers in the primary visual system of the rat. *Brain Res.* 272: 129-36.
- Wesolowski, H. 1968. The behavior of Golgi apparatus and the hydrolytic enzymes of the epithelial cells and the Bowman's gland cells in domestic birds after pyridine stimulation. *Zool. Poloniae* 18: 57-269.
- Whissel-Buechy, D., and J. E. Amoore. 1973. Odor blindness to musk: simple recessive inheritance. *Nature* 242: 271-73.
- White, E. L. 1973. Synaptic organization of the mammalian olfactory glomerulus : New findings including an intraspecific variation. *Brain Res.* 60: 299-313.
- Wilcox, M. Franceschini N. 1984. Illumination induces dye incorporation in photoreceptor cells. *Science* 225: 851-54.
- Willey, T. J. 1973. The ultrastructure of the cat olfactory bulb. *J. Comp. Neurol* 152: 211-32.
- Wood, P., S. Shirley, and G. Dodd. 1983. Effect of concanavalin A on frog olfactory mucosa. *Biochem. Soc. Trans.* 11: 781-82.
- Wysocki, C. J., G. Whitney, and D. Tucker. 1977. Specific anosmia in the laboratory mouse. *Behav. Genetics*, Vol 7: 171-88.
- Wysocki, C. J., and G. K. Beauchamp. 1984. Ability to smell androstenone is genetically determined. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* 81: 4889-902.
- Wysocki, C. J., K. M. Dorries, and G. K. Beauchamp. 1989. Ability to perceive androstenone can be acquired by ostensibly anosmic people. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* 86: 7976-78.
- Yamazaki, K., G.K. Beauchamp, I.K Egorov, J. Bard, L. Thomas, E.A. Boyse 1983. Sensory distinction between H-2b and H-2bm1 mutant mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 80: 5685-88.
- Yan, C., Zhao A. Z. Bentley J. K. Loughney K. Fergusson K. Beavo J. A. 1995. Molecular cloning and characterization of a calmodulin-dependent phosphodiesterase enriched in olfactory sensory neurons. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 92: 9677-81.
- Yee, K. K. Costanzo R. M. 1995. Restoration of olfactory mediated behavior after olfactory bulb deafferentation. *Physiol. Behav.* 58: 959-968.
- Yoshii, K., Kawamura, K. 1983. Role of cations in olfactory reception. *Brain Res.*, 274: 239-48.
- Yoshii, K., Kurihara, K. 1989. Inward rectifier produced by *Xenopus* oocytes injected with mRNA extracted from carp olfactory epithelium. *Synapse*, 3: 234-38.
- Zhao, H. Firestein S. Greer C. A. 1994. NADPH-diaphorase localization in the olfactory system. *Neuroreport* 6: 149-52.
- Zhao H, Ivic L, Otaki JM, Hashimoto M, Mikoshiba K, Firestein S 1998. Functional expression of a mammalian odorant

- receptor. *Science*, 279:237-42 .
- Zheng, L. M., M. Caldanì, and F. Jourdan. 1988. Immunocytochemical identification of luteinizing hormone-releasing hormone-positive fibres and terminals in the olfactory system of the rat. *Neuroscience*, 24:567-78.
- Zhou, Q. Hinckle G. Sogin M. L. Dionne, and V.E. 1997. Phylogenetic analysis of olfactory receptor genes from Mudpuppy. *Biol. Bull.* 193: 248-50.
- Ziegelberger, G. Van den Berg M. J. Kaissling K. E. Klumpp S. Schultz J. E. 1990. Cyclic CGMP levels and guanylate cyclase activity in pheromone-sensitive antennae of silkmooths *Antheraea polyphemus* and *Bombix mori*. *J. Neurosci.*, 10: 1217-25.
- Zielinski BS, ML Getchell, RL, Wenokur, TVGetchell 1989. Ultrastructural localization and identification of adrenergic and cholinergic nerve terminals in the olfactory mucosa. *Anat. Rec.*, 225:232-45.
- Zufall, F. Shepherd G. M. Firestein S. 1991. Inhibition of the olfactory cyclic nucleotide-gated ion channel by intracellular calcium. *Proc. R. Soc. London*: 246: 225-30.
- Zufall, F., S. Firestein, and G. M. Shepherd. 1991. Analysis of single cyclic nucleotide-gated channels in olfactory receptor cells. *J. Neurosci.* 11: 3573-80.
- Zufall, F. Hatt H. Firestein S. 1993. Rapid application and removal of second messengers to cyclic nucleotide-gated channels from olfactory epithelium. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 90: 9335-39.
- Zufall, F. Firestein S. Shepherd G. M. 1994. Cyclic nucleotide-gated channels and sensory transduction in olfactory receptor neurons. *Ann. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 23: 577-607.
- Zufall, F. Leinders-Zufall T. 1997. Identification of a long-lasting form of odor adaptation that depends on the carbon monoxide/cGMP second-messenger system. *J. Neurosci.* 17: 2703-12.
- Zupko, K, Y. Poria, and D. Lancet. 1991. Immunolocalization of cytochromes P450 olf1 and P450 olf2 in rat olfactory mucosa. *Eur. J. Biochem.* 196: 51-58.
-

Résumé de la thèse**Doctorat d'Etat, N°003-98, Université Claude Bernard, F-69622 Villeurbanne,****7 décembre 1998****DISCRIMINATION NERVEUSE OLFACTIVE ET REPRESENTATION DE
L'ODEUR PAR LE SYSTEME OLFACTIF.****Gilles SICARD**

Nous rapportons dans notre thèse un ensemble de travaux, pour l'essentiel publiés et effectués en collaboration, qui éclairent le fonctionnement de la périphérie du système olfactif et les règles qui président à l'encodage de l'odeur.

C'est bien l'interaction de molécules odorantes et des protéines réceptrices des odeurs qui est responsable de l'activation des neurones récepteurs olfactifs. Selon les données récentes de la littérature, le répertoire génomique des récepteurs serait vaste, de l'ordre de 1000 unités chez le rat, de plusieurs centaines chez les amphibiens. Selon certains, il n'y aurait qu'un seul type de récepteur exprimé par neurone récepteur olfactif. Or, nous montrons par des enregistrements unitaires des réponses transmises par les neurones récepteurs au moyen d'électrodes extracellulaires, chez la grenouille ou chez la souris, qu'un même neurone olfactif peut répondre à des molécules aussi différentes que le camphre, l'acétophénone et la cyclohexanone. Ceci, soit démontre une spécificité "large" des récepteurs, ou bien nie l'hypothèse d'une expression limitée de types de récepteurs aux odeurs par un même neurone récepteur.

L'interaction des ligands odorants et des récepteurs membranaires est suivie d'une cascade de réactions enzymatiques qui réalisent la transduction du signal chimique en message nerveux. Il existerait au moins deux seconds messagers intracellulaires impliqués dans la transduction olfactive, et recrutés par deux groupes de substances odorantes distincts. Nous montrons que certains neurones récepteurs olfactifs de la grenouille répondent à des substances appartenant aux deux groupes et donc que les deux mécanismes de transduction sont présents simultanément dans certains neurones récepteurs au moins.

Avec A. Duchamp, nous nous sommes intéressés à la transformation de l'information périphérique par l'intégration bulbaire en comparant les profils de sensibilité des neurones récepteurs olfactifs et ceux des deutoneurones du système olfactif (cellules mitrales) de la grenouille. Nous avons noté que bien que les cellules mitrales soient en moyenne plus sélectives que les neurones récepteurs olfactifs, leurs profils de sensibilité restent voisins de ceux enregistrés à la périphérie. Par ailleurs, nous avons examiné, chez la souris, la distribution topographique, glomérulaire, des activations périphériques transmises aux deutoneurones du système par l'intermédiaire des fibres primaires. L'analyse anatomo-fonctionnelle de ces projections épithélio-bulbaires au moyen du marquage métabolique par la méthode au 2-désoxy-glucose démontre, à la fois, une forte convergence de certaines fibres périphériques vers des foyers bulbaires, et, en même temps, l'existence d'une réponse glomérulaire plus étendue ou diffuse. Se superpose donc une convergence fonctionnelle à la convergence anatomique. Toutefois, il est difficile de croire que toute l'information spécifique du stimulus réside dans ces foyers puisque les lésions, localisées ou même extensives des bulbes olfactifs,

n'interdisent pas la manifestation de comportements olfactivement guidés appris avant lésion. Ces données sont discutées.

L'anosmie spécifique est un déficit partiel, héréditaire, de la perception olfactive qui ne concerne sélectivement que quelques substances odorantes et qui est constaté essentiellement chez le sujet humain. L'une des explications de ce déficit est qu'il manifeste une carence en récepteurs membranaires normalement engagés dans la reconnaissance de ces substances odorantes. En étudiant un modèle animal de l'anosmie spécifique à l'acide isovalérique proposé par nos prédécesseurs, nous découvrons d'abord qu'il s'agit plutôt d'une hyposmie spécifique. Ce défaut sélectif de sensibilité olfactive avait été constaté par des études du comportement au moyen de mesures cumulées sur plusieurs animaux. Nos travaux fondés sur des expériences comportementales montrent que tous les individus d'une souche ne sont pas atteints identiquement. Que ce soient les enregistrements électrophysiologiques de la muqueuse olfactive ou l'étude anatomo-fonctionnelle des projections bulbaires, nous démontrons également que la périphérie du système olfactif des souris réputées spécifiquement anosmiques à l'acide isovalérique est bien sensible à cette substance. Cependant, notre étude électrophysiologique de la sensibilité moyenne de la muqueuse olfactive des animaux réputés spécifiquement anosmiques à l'acide isovalérique, montre effectivement une altération, par comparaison avec des animaux témoins. Par ailleurs, nous montrons que les motifs d'activation glomérulaires évoqués par l'acide isovalérique et révélés au moyen du 2-désoxyglucose dans la souche de souris atteinte et chez des animaux témoins sont différents. Ces nouvelles données sont compatibles avec l'hypothèse d'une carence en récepteurs périphériques. Toutefois, la conception d'un codage par de multiples interactions différentes s'accorde mal avec l'existence d'anosmies spécifiques.

Or, le type de sélectivité des neurones récepteurs olfactifs vis à vis des molécules odorantes que nous observons indique que, généralement, une molécule odorante interagit avec plusieurs récepteurs, et suggère que la représentation périphérique caractéristique de l'odeur est une description détaillée du stimulus inscrite dans un motif d'activation plurineuronale. Cette description s'oppose à la conception d'un codage par des canaux dédiés (labelled lines), selon laquelle des voies très sélectives, étroitement accordées aux stimulus, encoderaient l'odeur. Nos données ne rendent pas impensable d'ailleurs que certains neurones de ce type, échappant à notre observation en raison même de leur forte sélectivité, puissent coexister avec les neurones moins sélectifs que nous observons.

On peut espérer en connaissant mieux les mécanismes périphériques de la discrimination olfactive, trouver des clés pour organiser l'espace des odeurs. Au cours des derniers paragraphes de notre thèse, nous avons examiné dans quelle mesure cet espoir peut être comblé.

Listes des publications

Sicard, G. Contribution à l'étude électrophysiologique des propriétés de discrimination des neurorécepteurs olfactifs. Thèse de 3^{ième} cycle, Université Claude Bernard, Lyon I, novembre 1980.

Sicard, G. Duchamp, A., Revial, M-F., and Holley, A. Odour discrimination by frog receptor cells: A recapitulative study. In *Olfaction and Taste VII*, Van der Starre (ed), IRL Press, London, 1980, pp171-174.

Revial, M-F., Sicard, G., Duchamp, A., and Holley, A. New studies on odour discrimination in the frog's olfactory receptor cells. I Experimental results. *Chem. Senses*, 1982, 7:175-190.

Revial, M-F., Sicard, G., Duchamp, A., and Holley, A. New studies on odour discrimination in the frog's olfactory receptor cells. II Mathematical analysis of electrophysiological responses. *Chem. Senses*, 1983, 8:179-184.

Sicard, G. and Holley, A. Receptor cell responses to odorants: similarities and différences among odorants. *Brain Research*, 1984, 292:283-296.

Duchamp, A. and Sicard, G. Odour discrimination by olfactory bulb neurons: statistical analysis of electrophysiological responses and comparison with odour discrimination by receptor cells. *Chem. Senses*, 1984, 9:1-14.

Duchamp, A. and Sicard, G. Influence of stimulus intensity on odour discrimination by olfactory bulb neurons as compared with receptor cells. *Chem. Senses*, 1984, 8:355-366.

Sicard, G. Olfactory discrimination of structurally related molecules: Receptor responses to camphoraceous odorants. *Brain Research*, 1985, 326:203-212.

Sicard, G. Electrophysiological recordings from olfactory receptor cells in adult mice. *Brain Research*, 1986, 397:405-408.

Royet, J.P., Sicard, G., Souchier, C. and Jourdan, F. Specificity of spatial patterns of glomerular activation in the mouse olfactory bulb : computer-assisted image analysis of 2-DG autoradiograms. *Brain Res.*, 1987, 417, 1-11.

Sicard, G., Royet, J.P. and Jourdan, F. A comparative study of 2-deoxyglucose patterns of glomerular activation in the olfactory bulbs of C57 BL/6J and AKR/J mice. *Brain Res.*, 1989, 481: 325-334.

Sicard, G. Receptor selectivity and dimensionality of odours at the stage of the olfactory receptor cells. In : *Chemosensory Information Processing*, D. Schild, ed., NATO ASI Series, Springer-Verlag, Berlin, 1990, vol. H 39, pp.21-32.

Duchamp-Viret, P., Duchamp, A. and Sicard, G. Olfactory discrimination over a wide concentration range. Comparison of receptor cell and bulb neuron abilities. *Brain Res.*, 1990, 517:256-262.

Pourtier, L. et Sicard, G. Comparison of the sensitivity of C57BL/6J and AKR/J mice to airborne molecules of isovaleric acid and amyl acetate. *Behavior and Genetics*, 1990, 20:499-509.

Deschaumes-Molinaro, C. Dittmar, A. Sicard, G. and Vernet-Maury, E. Autonomic nervous system responses confirm «autonomic responses specificity» hypothesis. *Homeostasis*, 1992, 33:225-234.

Holley, A. et Sicard, G. Les récepteurs olfactifs et le codage neuronal de l'odeur. *Médecine/Sciences*, 1994,10:1091-1108.

Delaleu, J.C. and Sicard, G. Electrophysiological and histological recovery of the olfactory mucosa of the frog after dichlobenil injection. *Chem. Senses*, 1995, 20: 433-440.

Féron, F., Lizard, G. Sicard G. Isolation of mature olfactory using retrograde labelling and flow-cytometry. *J. Neuroscience Methods*, 1995, 57:9-14.

Delaleu, J.C. and Sicard, G. Electrophysiological and histological recovery of the olfactory mucosa of the frog after dichlobenil injection. *Chem. Senses*, 1995, 20: 433-440.

Féron, F., Lizard, G. Sicard G. Isolation of mature olfactory using retrograde labelling and flow-cytometry. *J. Neuroscience Methods*, 1995, 57:9-14.

Godinot, N., Sicard, G., Dubois, D. Categories, familiarity and pleasantness of odors. *Odours and VOC's J.* 1995, 1, 202-208.

Royet, J-P., Paugam-Moisy, H, Rouby, C., Zighed, D., Nicoloyannis, N., Amghar, S., Sicard, G. Is short-term odor recognition predictable from odor profile? *Chem. Senses*, 1996, 21: 553-566.

Dubois, C. Rouby, C., Sicard, G. Catégories sémantiques et sensorialités: de l'espace visuel à l'espace olfactif. *Enfance*, 1: L'odorat chez l'enfant, perspectives croisées. Presse universitaires de France. 1997, pp 141-151.

Coronas, V., Féron, F., Hen, R., Sicard, G., Jourdan, F., Moyse. In vitro induction of apoptosis or differentiation by dopamine in an immortalized olfactory neuronal cell line. *J. Neurochemistry*, 1997, 69: 1870-1881.

Rouby, C., Sicard, G. Des catégories d'odeurs? In: *Catégorisation, représentation et systèmes symboliques*. Ed. Kimé, Paris, 1997.

Sicard, G., Chastrette, M. Godinot, N. Des représentations de l'espace olfactif: des récepteurs à la perception. *Intellectica*, 1997, 24:85-107.

Sicard, G., Feron, F., Andrieu, J.L., Holley, A., Mackay-Sim, A. Generation of neurons from a non-neuronal precursor in adult olfactory epithelium in vitro. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1997, 855:223-225.

Féron, F., Mackay-Sim, A., Andrieu, J.L. Matthaei, K., Holley, A. , Sicard, G. 1999. Stress induces neurogenesis in non-neuronal cell cultures of adult olfactory epithelium, *Neuroscience*, 88:571-83.

EPILOGUE

**"Ce qui est important est invisible pour les yeux"
Le petit prince, Saint Exupéry.**

ANNEXES : 10 ARTICLES

ANNEXES : 10 ARTICLES

New studies on odour discrimination in the frog's olfactory receptor cells. I. Experimental results

M.F.Revial, G.Sicard, A.Duchamp and A.Holley

Laboratoire d'Electrophysiologie and Laboratoire associé au CNRS de Physiologie Neurosensorielle, Université Claude Bernard, F-69622 Villeurbanne Cedex, France

(Received April 1982; accepted July 1982)

Abstract. New experiments were performed within a systematic investigation of the discriminative properties of olfactory receptor cells in the frog. Extracellular spike responses of receptor units were recorded during stimulation with 39 different odorants. Several general properties of the olfactory receptors, already described, were confirmed. The overall selectivity was found to be lower than in previous studies. Enantiomeric forms of citronellol and carvone were discriminated by several receptor cells, mainly in quantitative terms. In a series of eight cycloketones, each compound was the best stimulus for at least one receptor cell and some receptor cells had several 'best stimuli'. Five odorants were delivered at two concentrations. All the receptors responding to the lowest concentration also responded to the highest one.

Introduction

In order to study the mechanisms of odour discrimination at the peripheral level of the olfactory system, we have undertaken a series of experiments based on recording the electrical activity of receptor cell units in the olfactory mucosa of the frog. Our intention was to class and group odorants according to the responses that they elicited from olfactory receptors, a step towards the identification of the physicochemical properties relevant to the qualitative discrimination of odours.

In two early studies (Study I and II, Duchamp *et al.*, 1974; Revial *et al.*, 1978a,b) we investigated the receptor responses to two sets of 20 odorants. Mathematical analyses of the data indicated that the odour stimuli could be distributed in several groups based on similarities in stimulating properties. In addition, certain features of the receptor-cell sensitivity could be established, for example the ability of the receptor cells to respond to odorants belonging to several different groups, and their highly individualized sensitivity spectra.

These results have encouraged us to explore further the olfactory space by testing a wider range of qualitative and chemical properties. The preceding experiments showed that the opportunity of recording the electrical activity of a single receptor cell for periods of time exceeding one or two hours was rather exceptional. We therefore could not investigate the responses of single receptor units to a large number of stimuli in succession, and thus we had to limit each series of experiments to a set of ~20 different compounds. The present report deals with the experimental findings obtained with 39 different compounds distributed into two sets, each one tested on a distinct population of receptor cells. Because a series of odour compounds and the sample of receptor units

stimulated with these compounds form a unity with regard to the mathematical processing which is to be reported in a further paper (Revial *et al.*, 1982), we distinguished two parts in the whole experiment. They are referred to as 'Study III' and 'Study IV', respectively.

Materials and methods

Odorants

The odorants are listed in Tables I and II.

Choice. They were chosen according to several criteria. Some odorants that had been tested in earlier studies were reintroduced in order to make a comparison between the different experimental series: camphor, acetophenone, cyclohexanone in Study III; cyclohexanol, cineole, benzaldehyde, menthol, pyridine in Study IV. Other chemicals were included because their odour resembled that of odorants that had been found grouped in previous experiments (Amoore, 1970); they were isoborneol, camphor-quinone and several cycloketones in Study III. We were also interested in investigating the receptor responses to the members of a well-defined chemical series. Cycloketones, already used in experiments on 'selective degeneration' following long-lasting exposure to odorants (Pinching and Døving, 1974) were introduced in Study III together with straight-chained

Table I. Odorants used in Study III with an estimation of their concentration in the stimulating odour flow. The different concentrations vary from 1/5 to 1/3 of the saturated vapour pressure.

	Code	Chemical name	Concentration (x 10 ¹⁴ mol- ecules x ml ⁻¹)
1	DCI	<i>d</i> -Citronellol	6
2	LCI	<i>l</i> -Citronellol	6
3	DCA	<i>d</i> -Carvone	15
4	LCA	<i>l</i> -Carvone	15
5	IBO	Isoborneol	30
6	CAM	<i>dl</i> -Camphor	30
7	CAQ	Camphorquinone	<1
8	MAC	Methyl-amylketone	150
9	DPC	Dipropylketone	100
10	PIN	Pinacolone	350
11	ACE	Acetophenone	60
12	CPN	Cyclopentanone	2000
13	XON	Cyclohexanone	550
14	CHN	Cycloheptanone	150
15	CNN	Cyclononanone	80
16	CDN	Cyclodecanone	35
17	UDN	Cycloundecanone	5
18	TDN	Cyclotetradecanone	1
19	ODN	Cyclooctadecanone	<1
20	MCN	Musk ketone	<1

Odour discrimination in receptor cells

Table II. Odorants used in Study IV with an estimation of their concentration in the stimulating odour flow. For several compounds the saturated vapor pressure could not be known and the concentrations were not determined.

	Code	Chemical name	Concentration ($\times 10^{14}$ molecules \times ml $^{-1}$)	
			C ₁	C ₂
1	BZA	Benzaldehyde	90	35
2	CIN	Cineole	75	45
3	CYM	<i>p</i> -Cymene	100	
4	DMS	α ,4-Dimethylstyrene	65	
5	HEX	2-Hexen-1-al	—	
6	IQI	Isoquinoline	10	
7	LIM	<i>d</i> -Limonene	150	100
8	MTA	<i>p</i> -Menthane	200	
9	MTN	Δ 3, <i>p</i> -Menthene	—	
10	MEN	Menthol	7	
11	PHE	Phenol	200	
12	PYR	Pyridine	650	450
13	PYL	1-Methyl-pyrrole	—	
14	QUI	Quinoline	10	
15	TER	α -Terpinene	—	
16	THY	Thymol	6	
17	XAN	Cyclohexane	6300	
18	XCA	Cyclohexane -carboxaldehyde	—	$\frac{1}{2} \times C_1$
19	XOL	Cyclohexanol	100	

ketones for comparison. Two pairs of enantiomeric compounds known to have different odour qualities, *d*- and *l*-carvone (Friedman and Miller, 1971), *d*- and *l*-citronellol (Ohloff, 1972), were tested in Study III. The choice of some compounds was also guided by the purpose of associating structurally-related chemicals in the same series of experiments, especially in Study IV. Finally, we wanted to introduce chemicals with odour qualities not represented in the previous experiments, for example terpenes introduced in Study IV.

Purity. The compounds used in Study III were obtained from Fluka and Merck. They were of the higher purity grade commercially available and were checked by gas chromatography. Several of the cycloketones were provided by K.B.Døving (Oslo). The samples of enantiomers, provided by Roure-Bertrand-Dupont, were checked for optical purity by polarimetry. The purity ranged from 95% and 99%. *l*-Carvone smelt like spearmint oil and *d*-carvone like caraway oil; *l*-citronellol was reminiscent of the Bulgarian rose odour and *d*-citronellol, of that of citronella oil. All the chemicals tested in Study IV were offered free by Polak's Frutal Works, B.V., Amersfoort, Holland. They were of a purity grade higher than 99.5%, as checked by gas liquid chromatography.

In preliminary experiments, we observed that stimulations with one of the

previously selected compounds, 1-methyl pyrrolidine, induced very large electro-olfactogram (EOG) responses, exceeding 10 mV, and produced long-lasting impairment of the mucosal sensitivity. The use of this chemical being incompatible with our experimental purposes, it was withdrawn from the stimulus set.

Stimulation intensity. The receptor cells were stimulated with rather high odorant concentrations. We have previously discussed the reasons for our choice (Revial *et al.*, 1978a). Briefly, we were interested in knowing the degree of odour discrimination which would persist despite the unfavorable conditions introduced by the use of relatively high odour concentrations because this residual discrimination would clearly point out distinct receptive mechanisms. As a matter of fact, prior experiments have shown that the receptor cells kept noticeable discriminative properties even when the stimulus was delivered at a few tenths of the saturated vapour pressure (Duchamp *et al.*, 1974; Revial *et al.*, 1978a,b). In addition, it was never observed that a receptor cell responding to a low concentration of an odour stimulus did not respond to a higher one (unpublished observations on concentration-response relationships). Special care was taken to equalize the odorized flows, and therefore the concentrations, of the enantiomeric forms of carvone and citronellol. For the three straight-chained ketones and the eight cycloketones, the odorant flows were also equalized so that the concentrations delivered were in the same proportion as the saturated vapour pressures of the odorants. In order to gain information regarding the interaction between quality and intensity in the odour discrimination by the receptor cells without lengthening the duration of the trials too much, five of the chemicals were delivered at two different concentrations in Study IV. Moreover, the dilution rates of saturated vapours were adjusted so that the slightly active odorants were less diluted than the strongly efficient ones. The concentration values for the different stimuli were calculated using published values of the saturated vapour pressures and the values of the dilution rates of the odour vapours. These concentrations are given in Tables I and II. The EOGs ranged from 0.1 to 5 mV.

Methods

The experimental set-up and the methods were described in detail in a previous paper (Duchamp *et al.*, 1974).

Preparation. The *eminencia olfactoria* of pithed frogs were exposed by removing the roof of the nasal cavity. The animals were maintained at 13°C throughout the experiments in order to lengthen the survival time of the preparation. Frogs with a very thick or opalescent mucus over the olfactory epithelium were rejected.

Stimulation. The 20 or 19 different odorous stimuli of each experimental study were available from a multichannel olfactometer. They were delivered as 2-s puffs of saturated vapour introduced in a longer-lasting flow of pure nitrogen. The stimulations were given at random every second minute. In experimental Study IV, for five odorants, a lower concentration was delivered after the 19 normal stimulations were completed. When it was possible, additional stimulations were delivered to some units in order to study certain particularities of their responses.

Odour discrimination in receptor cells

Recording. Metal-filled glass capillaries were used to record extracellular electrical activity from single olfactory receptor cells. Special care was taken to select single unit activity from the observation of the shape, amplitude, and intervals of the spikes (Revial *et al.*, 1978a). The following criteria were specially considered: constant total amplitude; constant ratio between positive and negative spike phases; absence, in the spontaneous discharge and in the responses, of interspike intervals shorter than 50 ms. This value was found to be the limit of the instantaneous frequency observed during the strongest responses. Recordings suspected to involve more than one nerve unit were not kept. These recordings were obtained from various parts of the *eminencia olfactoria*, with the exception of the rostral pole of this structure which was little explored. The EOG was always recorded and observed as a control of the responsiveness of the whole mucosa.

Evaluation of responses. The resting frequency was calculated as the mean number of spikes occurring during 20 s preceding the stimulus delivery in the course of each trial. Excitatory responses were measured in terms of maximum firing frequency calculated from the smaller two or three successive interspike intervals. This criterion was chosen because the responses typically consisted of a progressive decrease of the interspike intervals up to a minimum value, followed by a progressive return to the pre-stimulation value. As reported in the Results, some responses exhibited spike amplitude decrement and the discharge was interrupted after the initial acceleration. In these cases, the frequency was evaluated by measuring the intervals between the last observable spikes. The strength of these responses was possibly under evaluated. When the stimulation induced a reduction of spike activity, the response was evaluated according to the duration of the silent period. No confusion was possible between spike suppression and decremental excitatory response because in the latter case the period of discharge interruption was always preceded by a brief burst of spikes at high frequency.

Results

Spontaneous activity and responses

We recorded the responses from 71 units belonging to 28 frogs in Study III, and from 53 units belonging to 27 frogs in Study IV. Eighty per cent of the units were located at a depth ranging between 100 and 200 μm . Most of the recorded spikes displayed triphasic configuration resembling that of axon spikes described by Getchell (1973).

As in the preceding studies, the spontaneous activity was found to be low. The mean resting frequency was <25 spikes/min for 70% of the units. The highest resting frequency was 200 spikes/min, found in one case only (Figure 1).

Depending upon the interaction of each odorant with each unit, the stimulations could induce different changes in the spontaneous discharge. The increases in frequency, referred to as excitatory responses, did not exceed 20 spikes/s. Reductions or interruptions of spike activity were rarely observed. A unit excited by several chemicals usually displayed a quantitatively different response to each stimulus. For example, unit 119.3 gave excitatory responses to all the chemicals except camphor which failed to induce any change in spike discharge. In the 19

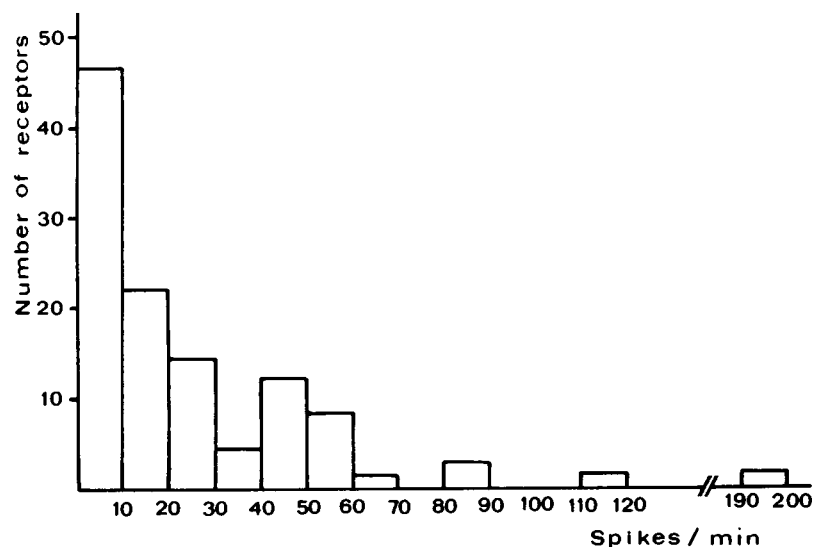


Fig. 1. Histogram of receptor cell spontaneous activity.

cases the response discharge frequency varied between 4 and 20 spikes/s, with numerous intermediate values. The same series of stimuli delivered a second time to the same unit 1 h later elicited exactly the same 19 responses with identical characteristics of latency and frequency (Figure 2). This confirms, for a given unit, the very good reproducibility and stability of the responses.

High-rate responses were often characterized by a progressive diminution of the spike amplitude in the burst. These 'decremental' responses were usually associated with discharge rates of ~20 spikes/s, but some appeared at a frequency lower than 10 spikes/s. Twenty-one percent of the excitatory responses in Study III and 8% in Study IV presented this characteristic. Such responses were sometimes followed by several seconds of spike inactivity, but the ability of the unit to respond to further stimulation 1 min later was not impaired.

Five per cent of the excitatory responses, mainly those of 'decremental' type, were followed by a typical change in discharge time-patterning. The stimulation induced rhythmical bursts of spikes which persisted for 10 min in some cases. In Study III, such responses were observed in 10 receptor cells; each of them showed this reaction to one to five stimuli. A total of 14 different odorants were able to elicit this discharge patterning.

Receptor selectivity

In Study III, 1420 stimulations were performed. An overall responsiveness of 49% was observed, with 662 (46.7%) excitatory responses and 33 (2.3%) cases of discharge interruption. The latter type of response was observed with 9 different compounds in nine receptor units. In three units, the spike interruption was the only type of response observed; however, in 6 units excitatory responses could also be obtained with other stimuli. Six receptor units failed to respond to the

Odour discrimination in receptor cells

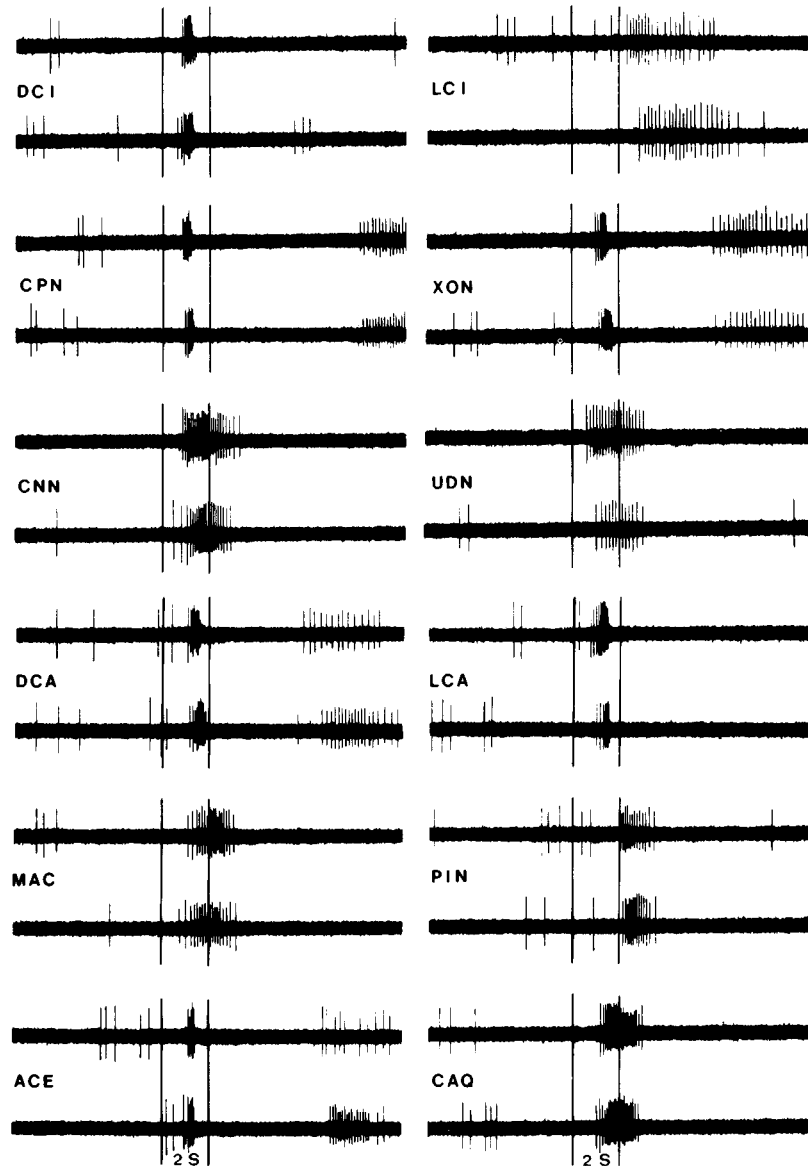


Fig. 2. Different excitatory responses recorded from one receptor cell (119.3). Each odorant was delivered twice. For each pair of tracings the lower trace was recorded one hour after the upper one. The characteristics of the response to a given compound are reproducible. Stimulus delivery is indicated by vertical lines.

whole set of odorants.

In Study IV, 1007 trials were followed by 370 (37%) excitatory responses and only one undisputable case of spike interruption. Seven units did not respond to the stimuli.

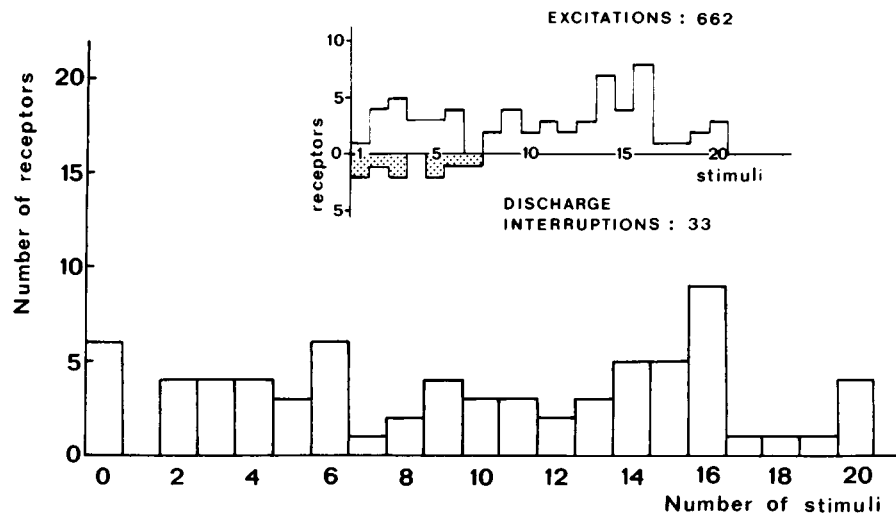


Fig. 3. Study III. Histograms of receptor selectivity. The receptor cells are distributed in classes according to the number of responses to 20 different stimuli. Excitatory and suppressive responses are separated in the upper diagram and mixed in the lower one.

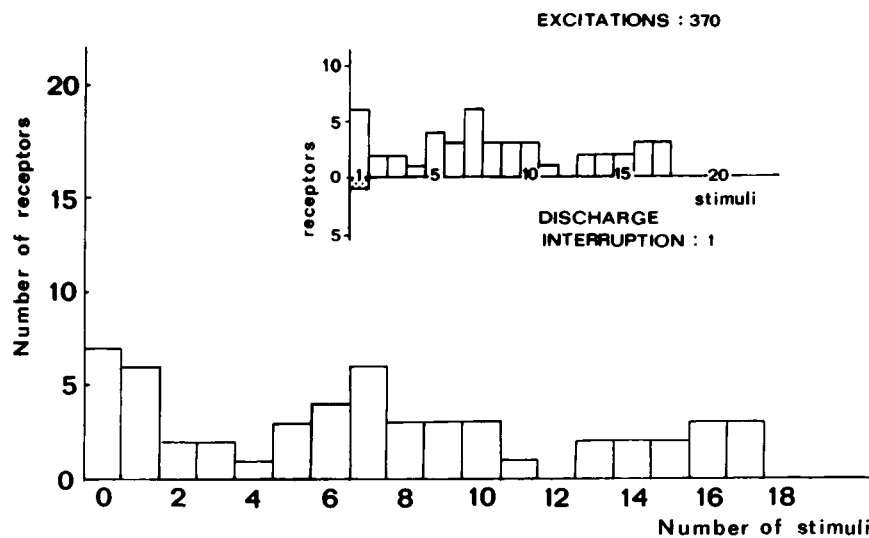


Fig. 4. Study IV. Histograms of receptor selectivity. The receptor cells are distributed in classes according to the number of excitatory responses to 19 different stimuli.

The histograms in Figures 3 and 4 show the distribution of the receptor cells in various classes of responsiveness according to the number of different odorants to which they responded. It may be observed that many cell units were sensitive to a large number of odorants. In Study III, four cells responded to all the 20 chemicals, and nine cells responded to 16 stimuli. The picture was not markedly

Odour discrimination in receptor cells

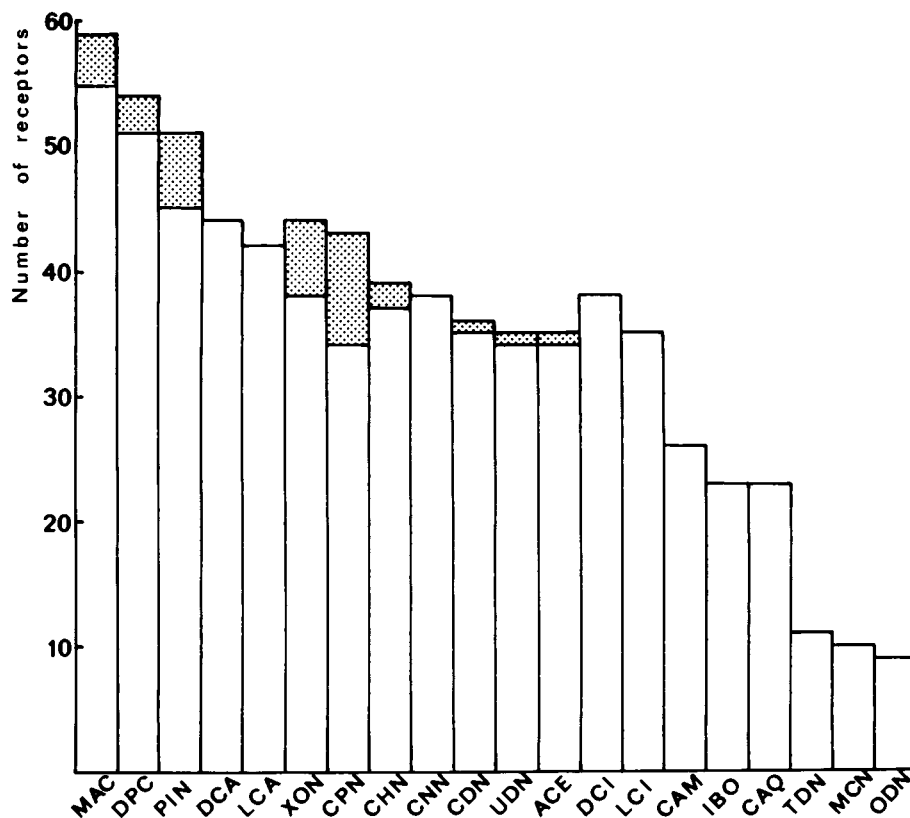


Fig. 5. Study III. Stimulating effectiveness of the 20 odorants tested on 71 receptor cells. Empty bars: excitatory responses. Dotted bars: suppressive responses.

different in Study IV, except that no receptor cell responded to more than 17 odorants.

Stimulating efficiency of odorants

The relative stimulating effectiveness of the chemical is illustrated in Figures 5 and 6. It can be seen that the straight-chained ketones (Figure 5) affected most of the receptor units. Among the cycloketones, only a small decrease in stimulating effectiveness was noted from C_5 (60.5%) to C_{11} (49.3%), although the concentrations varied in the range of 400 to 1. The heaviest ketones, C_{14} , C_{18} and musk-ketone, which were the least efficient stimuli affected ~14% of the receptor cells. It will be further noted that camphorquinone which was >30 times less concentrated than isoborneol elicited the same number of responses. The two enantiomeric forms of carvone and of citronellol excited almost the same number of receptor units, the *l*-form being slightly less efficient in both cases. In Study IV, the most efficient stimuli were benzaldehyde, cineole and *p*-cymene which affected 56% of the receptor cells; the least efficient was 1-methyl-pyrrole (17%). The other compounds stimulated an intermediate number of receptor cells.

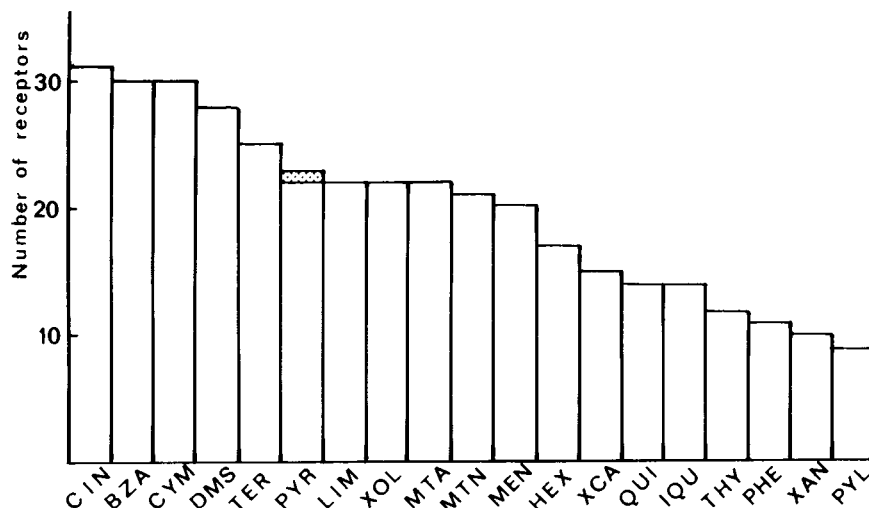


Fig. 6. Study IV. Stimulating effectiveness of the 19 odorants tested on 53 receptor cells. The single suppressive response (to pyridine) is distinguished.

Odour discrimination

Figures 7 and 8 give a schematic presentation of the quantitative data. The area of each spot is approximately proportional to the maximum frequency of a cell discharge under the corresponding stimulation. In the absence of response to a given stimulus, the spot represents the spontaneous activity. The units from which no response could be elicited are not represented.

In Study III (Figure 7) a large number of receptor cells gave the same type of response to each of the two enantiomeric forms of carvone and of citronellol. Forty-two receptor cells responded to both *d*- and *l*-carvone, and only two clearly discriminated the isomers. Thirty-five receptor cells confused *d*- and *l*-citronellol, and only 3 distinguished between them. However, the frequency of the discharge elicited by *d*-carvone was higher than that elicited by *l*-carvone in 25 receptor cells, while it was smaller in 10 receptors. The *d*-form of citronellol was also more efficient than the *l*-form (20 against 9). The two isomers methyl-amylketone and dipropylketone that were very efficient stimuli were poorly discriminated; only 5 receptor cells were able to distinguish between them. Isoborneol and camphor elicited common excitatory responses from 21 receptor cells. Only 7 receptor cells that responded to one of them failed to respond to the other.

Interesting observations can be made regarding the responses to the eight cycloketones. Several examples of the receptor response profiles to these ketones are illustrated in Figure 9. It will be first noted that the receptor cells presented different degrees of discriminative ability, some of them responding to only one ketone (15,6), others responding to all of them (14,36,17). High sensitivity to a given compound was often associated with lower sensitivity to heavier and lighter compounds. Such a 'tuning' of the receptor sensitivity to a certain number of C atoms was more or less sharp (compare for example receptors 46 and 58). It will

Odour discrimination in receptor cells

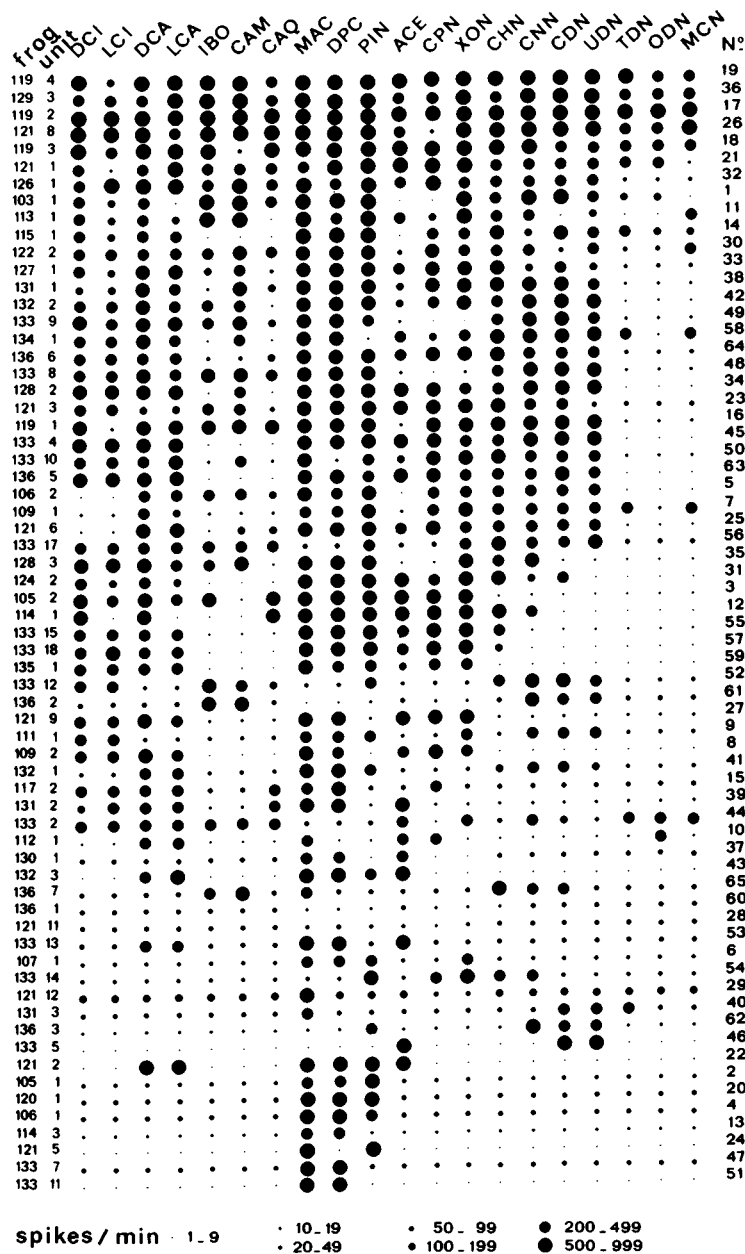


Fig. 7. Study III. Diagrammatic representation of receptor cell activity following odour stimulation. The spot size is roughly proportional to spike frequency. Along a line a response appears as a larger spot (excitation) or a smaller spot (suppression) with respect to equally-sized spots representing the resting frequency. Receptor cells are identified by the number of the frog followed by the number of the unit (left column) and by a serial number (right column). Columns were disposed in order to group odours according to their chemical structure and lines are approximately arranged according to the decreasing number of responses.

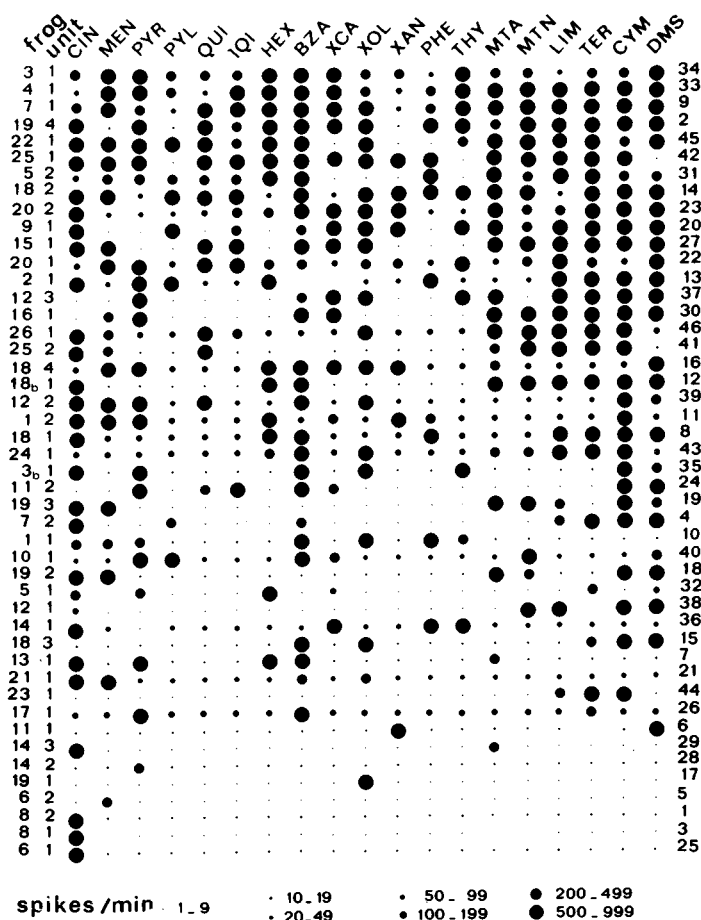


Fig. 8. Study IV. Diagrammatic representation of receptor cell activity following odour stimulation. The spot size is roughly proportional to spike frequency. Along a line a response appears as a larger spot (excitation) or a smaller spot (suppression) with respect to equally-sized spots representing the resting frequency. Receptor cells are identified by the number of the frog followed by the number of the unit (left column) and by a serial number (right column). Columns were disposed in order to group odours according to their chemical structure and lines are approximately arranged according to the decreasing number of responses.

be further noted that almost all the ketones between C_5 and C_{14} could be the best stimulus for at least one receptor cell. In addition, the complex response profiles of some receptors suggested that they were tuned to several chemicals in different parts of the ketone series (receptors 45,14).

In Study IV (Figure 8), it was observed that the position isomers quinoline and isoquinoline were clearly discriminated by 4 receptor cells that responded to only one of them, while a further 3 made a quantitative discrimination and 6 confused them. A large number of receptor cells gave similar responses to *p*-cymene and

Odour discrimination in receptor cells

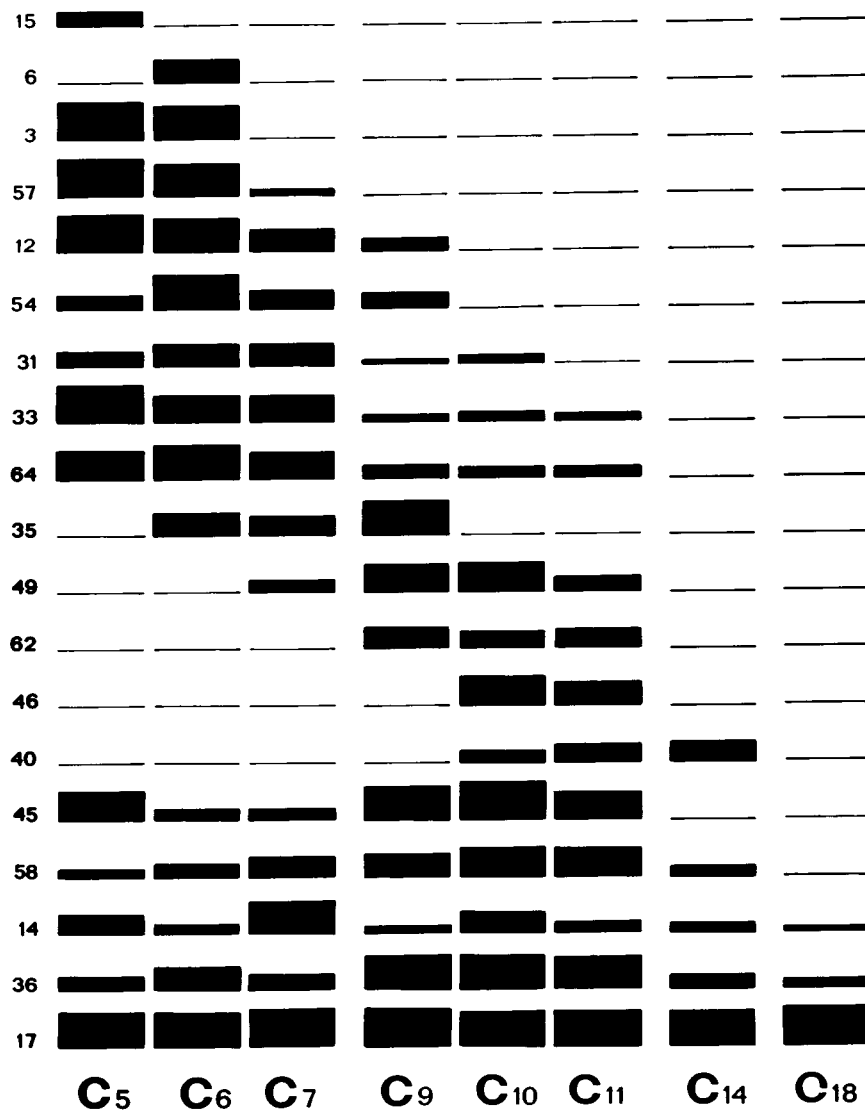


Fig. 9. Separate presentation of the receptor cell responses to eight cycloketones (from Figure 7). The selected examples illustrate various receptor response profiles. Cells identified with reference to Figure 7. Bar height is proportional to spike discharge during response.

dimethylstyrene. Menthane, menthene and limonene also elicited a majority of common responses.

Effects of change in stimulus concentration

Five of the 19 odorants tested in Study IV could be delivered at two concentrations, the lowest of which being reduced by 25% to 40% with respect to the highest one (Table II). The highest concentrations (C1) elicited 83 responses

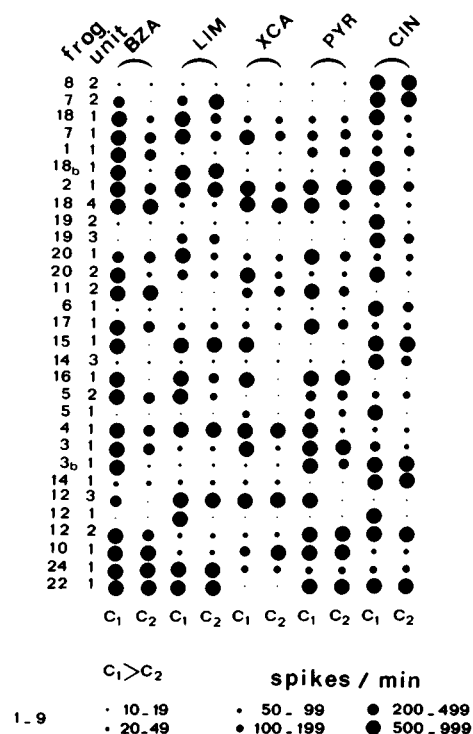


Fig. 10. Study IV. Receptor cell responses to two different concentrations of 5 odorants. The estimated concentrations are presented in Table II. Same concentrations as in Figure 8 for C₁.

following 150 stimulations against 60 with the lowest concentrations (C₂) (Figure 10). All the receptors responding to the lowest concentrations of a stimulus also responded to the highest. The responses to C₁ were equal to or stronger than those to C₂, except in two cases (7.2, limonene; 10.1, cyclohexane carboxaldehyde).

Discussion

Several aspects of the findings confirm observations already reported and discussed in earlier studies (Duchamp *et al.*, 1974; Holley *et al.*, 1974; Revial *et al.*, 1978a), namely the range of the receptor spontaneous activity, the various time patternings of the responses, including rhythmical bursts of spikes following strong excitatory responses. Regarding the 'decremental' aspect of the spike size during some cell responses, a recent study (Juge *et al.*, 1979) suggested that it is associated with an excessive depolarization of the receptor cells under strong stimulation.

The induction of a cyclic pattern of cell activity by some stimuli has been reported in a previous study (Revial *et al.*, 1978a). Clearly, this property does not characterize a particular type of odorant since it was occasionally displayed by

Odour discrimination in receptor cells

70% of them in the present Study III. It is also not a systematic characteristic of the response of the investigated receptors since normal-type responses were also observed in these cells. More likely, the rhythmical discharges are related to the strength of the excitation, that is to the conjunction of a high odour concentration and a high sensitivity of the receptor cell.

The selectivity of the receptor cells as found in these experiments was markedly lower than in the two previous studies. This is possibly in connection with an increase in concentration for some stimuli. The decreased selectivity was also a consequence of the presence, in the stimulus set, of very active compounds such as the straight-chained ketones in Study III which were able to stimulate most of the receptor cells.

A small variation of the odour concentration made with 5 odorants in Study IV produced a noticeable change in the number of excitatory responses elicited from the sample of receptors. Two remarks can be made about this result. First, a strong influence of the stimulus intensity on the rate of responses was expected on the basis of previous studies of concentration-response relations in frog receptor cells (Holley *et al.*, 1977) and unpublished results. It was demonstrated that in the majority of the receptor cells, the dynamic range of the concentration-response function, from the threshold to the maximum response, was not wider, and sometimes far less than one log unit. Second, the highest concentration of an odorant always elicited a response from a cell which had responded to the lowest. This also agrees with the experiments mentioned above.

The discussion of the results which are relevant to quality discrimination will be fully developed in a subsequent paper. In this paper, we focus attention on the discrimination of the 8 cycloketones. First, it appears that the lightest ketones, which were also the most concentrated, were not the most effective stimuli for all the receptor cells. Actually, the stimulating effectiveness was almost evenly distributed from C₅ to C₁₄. Second, when the responses are expressed in quantitative terms (Figure 9), it becomes clear that each compound (with the possible exception of C₁₁) was the best stimulus for at least one receptor cell. Third, it can be seen that the receptor cells show various degrees of selectivity in their responses, from one to eight responses to the eight cycloketones.

These data suggest a comment concerning the membrane components which perform the first steps of the processes leading to the responses observed. It is difficult to account for the cycloketone discrimination assuming a unique type of detection mechanism in the receptor membrane. The diversity of the 'best stimuli' and the various degrees of selectivity displayed by the receptor cells are more in favour of a plurality – and even a large plurality – of membrane acceptor types in the recorded cells. The ketone function does not therefore appear as being detected *per se*. Other factors, possibly related to the molecule size, play a determining role in the discrimination process.

An interesting finding is the existence of several peaks of sensitivity in the response profile of some receptor cells to cycloketones. It was argued (Holley and Døving, 1977) on the basis of previous experiments (Duchamp *et al.*, 1974; Revial *et al.*, 1978a,b) that the sensitivity of individual receptor cells to odorants belonging to markedly distinct groups indicated the presence of several types of accep-

tors in the membrane of a single cell. The 'tuning' of some receptor cells to several regions of the ketone spectrum can be taken as a support for this concept.

Acknowledgements

We wish to acknowledge the aid of Mr. E.H.Polak for the choice of odorants. We are indebted to Dr. D. Kettenes, Central Research Laboratory, Polak's Frutal Works (Holland) and Roure-Bertrand-Dupont (France) for kindly supplying odor compounds. We thank Dr. K.B.Døving for providing several cycloketones and for discussing many aspects of these studies. This work was supported by grants from CNRS (GRECO 32 'Olfaction' and GIS 'Physiologie sensorielle').

References

- Amoore, J.E.: 1970, Thomas, C.C. (ed.), *'Molecular Basis of Odor'*, Springfield. p. 200.
- Duchamp, A., Revial, M.F., Holley, A., and MacLeod, P.: 1974, 'Odor discrimination by frog olfactory receptors', *Chem. Senses*, **1**, 213-233.
- Friedman, L., and Miller, J.G.: 1971, 'Odor incongruity and chirality', *Science (Wash.)*, **172**, 1044-1046.
- Getchell, T.V.: 1973, 'Analysis of unitary spikes recorded extracellularly from frog olfactory receptor cells and axons', *J. Physiol.*, **234**, 533-550.
- Holley, A., Duchamp, A., Revial, M.F., Juge, A., and MacLeod, P.: 1974, 'Qualitative and quantitative discrimination in the frog olfactory receptors: analysis from electrophysiological data', *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **237**, 102-114.
- Holley, A., and Døving, K.B.: 1977, 'Receptor sensitivity, acceptor distribution, convergence and neural coding in the olfactory system', in Le Magnen, J., and MacLeod, P. (eds.), *Olfaction and Taste VI*, I.R.L., London, pp. 113-123.
- Holley, A., Delaleu, J.C., Revial, M.F., and Juge, A.: 1977, 'Quantitative stimulation of frog olfactory receptors: concentration-response relationships', 2nd ECRO Congress, Reading, UK (oral presentation).
- Juge, A., Holley, A., and Rajon, D.: 1979, 'Olfactory receptor cell activity under electrical polarization of the nasal mucosa in the frog. II. Responses to odour stimulation', *J. Physiol.*, **75**, 929-938.
- Ohloff, G.: 1972, in Schneider, S. (ed.), 'Odorous properties of enantiomeric compounds', *Olfaction and Taste IV*, Wissenschaftl. Verlagsgesellschaft, Stuttgart, pp. 156-160.
- Pinching, A.J., and Døving, K.B.: 1974, 'Selective degeneration in the rat olfactory bulb following exposure to different odours', *Brain Res.*, **82**, 195-204.
- Revial, M.F., Duchamp, A., and Holley, A.: 1978a, 'Odour discrimination by frog olfactory receptors: a second study', *Chem. Senses*, **3**, 7-21.
- Revial, M.F., Duchamp, A., Holley, A., and MacLeod, P.: 1978b, 'Frog olfaction: odour groups, acceptor distribution and receptor categories', *Chem. Senses*, **3**, 23-33.
- Revial, M.F., Sicard, G., Duchamp, A., and Holley, A.: 1982, to be submitted to *Chem. Senses*.

New studies on odour discrimination in the frog's olfactory receptor cells. II. Mathematical analysis of electrophysiological responses

M.F.Revial, G.Sicard, A.Duchamp and A.Holley

Laboratoire d'Electrophysiologie and Laboratoire associé au CNRS de Physiologie Neurosensorielle, Université Claude Bernard, F-69622 Villeurbanne Cedex, France

(Received December 1982; accepted July 1983)

Abstract. Revial *et al.* (1982) reported the experimental findings obtained in cell units stimulated with two new sets of odorants. The present paper deals with mathematical processing of these electrophysiological data. The multidimensionality of the odour space was confirmed. Camphor, isoborneol and cineole appeared to represent a 'camphor group' markedly discriminated from other odorants. A 'terpene group' including terpinene, dimethylstyrene, limonene and cymene and related to menthane and menthene was observed. A series of 8 cycloketones was found to have a linear pattern in the factorial planes and to be subdivided into three subsets. Cyclooctadecanone and cyclotetradecanone displayed correlations and spatial relationships with musk ketone while cycloundecanone, cyclodecanone and especially cyclononanone were more related to the 'camphor group'. Separate processing of the unitary responses of 12 receptor cells recorded from a single preparation led to the building of a factorial space resembling that constructed with the full collection of data. The incidence of odorant concentration on similarity evaluation is discussed on the basis of receptor responses to two different concentrations of some of the odorants.

Introduction

Analysing electrophysiological responses of single receptor cells has proved to be a valuable approach towards understanding the mechanisms responsible for the receptive and discriminative properties of the peripheral olfactory system. In two previous studies our group investigated the responses of the olfactory receptor cells of the frog to two sets of 20 odorants (Duchamp *et al.*, 1974; Revial *et al.*, 1978a) and proposed an interpretation of the findings based on multidimensional analysis (Revial *et al.*, 1978b). Two additional series of experiments have been performed recently with new stimuli, in order to widen the range of qualitative and chemical properties represented by the tested odorants. The experimental results obtained in these studies have been reported in a previous paper (Revial *et al.*, 1982). A complementary analysis of the results is presented here. It is based upon computation of correlation coefficients and on factor analysis.

Methods

The physiological data that are analysed here were obtained with the use of recording and stimulation techniques described in Revial *et al.* (1982). The method consisted of recording the extracellular activity of individual receptor cells in the olfactory mucosa of the frog stimulated by pure chemicals. In one of the two series of cell recordings (Study III), 20 odorants were tested on 71 recep-

tor cells; in the second series (Study IV), 19 odorants and 53 receptor cells were investigated. The odorants were the following: **Study III:** d-citronellol (DCI), l-citronellol (LCI), d-carvone (DCA), l-carvone (LCA), isoborneol (IBO), dl-camphor (CAM), camphor-quinone (CAQ), methyl-amylketone (MAC), di-propylketone (DPC), pinacolone (PIN), acetophenone (ACE), cyclopentanone (CPN), cyclohexanone (XON), cycloheptanone (CHN), cyclononanone (CNN), cyclodecanone (CDN), cycloundecanone (UDN), cyclotetradecanone (TDN), cyclooctadecanone (ODN), musk ketone (MCN); **Study IV:** benzaldehyde (BZA), cineole (CIN), p-cymene (CYM), α ,4-dimethylstyrene (DMS), 2-hexen-1-al (HEX), isoquinoline (IQI), d-limonene (LIM), p-menthane (MTA), Δ 3,p-menthene (MTN), menthol (MEN), phenol (PHE), pyridine (PYR), 1-methylpyrrole (PYL), quinoline (QUI), α -terpinene (TER), thymol (THY), cyclohexane (XAN), cyclohexane carboxaldehyde (XCA), cyclohexanol (XOL).

The receptor responses were expressed in terms of maximum spike frequency and the spontaneous activity was noted in absence of response. Several cell units that did not respond to any of the odour stimuli were discarded. The results were summarized in two numerical matrices of 20 x 65 and 19 x 46 values. It is on these numerical values that the mathematical processings were first performed. Further calculations were carried out on the results of a concentration study in which five of the odour stimuli of Study IV were used at two concentrations in order to tentatively estimate the possible incidence of stimulus intensity on similarity evaluation.

The responses of all the receptor cells to each pair of odorants were first compared using the Pearson's r correlation coefficient. The numerical tables were then processed according to Benzecri's 'analyse des correspondances' (Benzecri, 1973). This analysis led to multidimensionally representing the variables (odorants) and the observations (receptor cells) as vectors in a multidimensional space. In this representation, proximities between variables depend on differences between both angles and lengths of representative vectors. Odorants eliciting responses from the same receptor cells tend to be located in close proximity in the factor planes.

Results

Evaluation of similarities between odorants

Correlation coefficient. The distributions of the values of the Pearson's r correlation coefficient for all the 190 pairs of odorants used in Study III and the 171 pairs tested in Study IV are presented in Figures 1 and 2, respectively. The corresponding histograms display fairly similar features. For example, in both studies the negative values for r are rare and no one reaches the significance threshold at 5%. However, in Study III, the modal class is 0.3–0.4, whereas it is only 0.2–0.3 in Study IV. The percentage of significant positive values is markedly higher in Study III than in Study IV (69% vs 43%), which indicates that the odorants tested in the former study exhibited a higher degree of similarity with each other. Figures 3 and 5 diagrammatically present the highest r values, all significant, computed for Study III and Study IV and divided into three classes

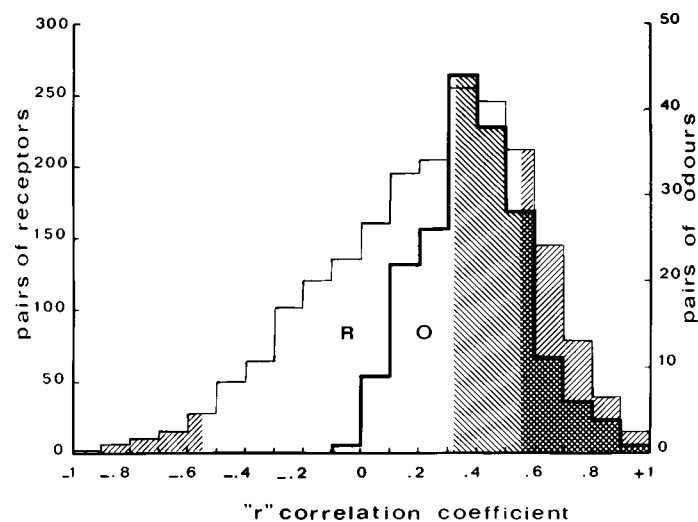


Fig. 1. Study III. Distribution of the Pearson's r correlation coefficient values for the pairs of odours (○) and the pairs of receptors (R). Hatched bars: r values significant at the 1% threshold.

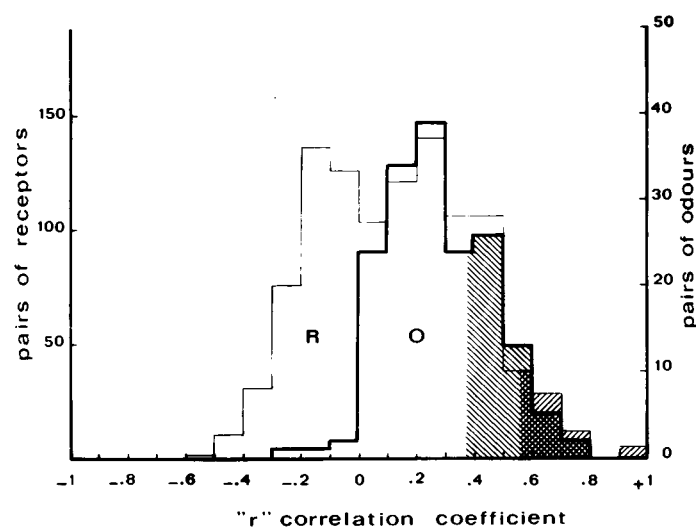


Fig. 2. Study IV: same legend as Figure 1.

symbolized by different lines.

The diagram illustrating Study III shows that two odorant pairs are highly correlated, CAM and IBO on the one hand, and the two forms of carvone on the other hand (LCA, DCA). Lower but still significant r values are further noted for the other enantiomers, DCI, LCI, and for the isomers MAC and DPC. The eight cycloketones of the odour sample are dispersed between three networks. The first network includes the heaviest ketones, ODN and TDN, which are highly cor-

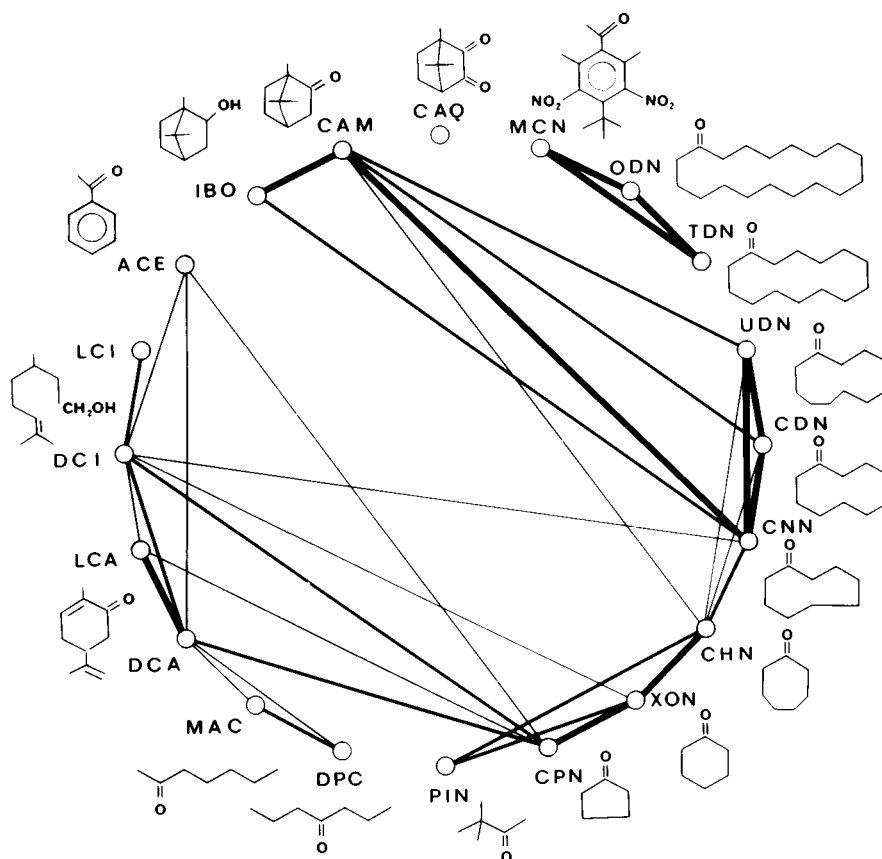


Fig. 3. Study III: Correlations between odorants according to the calculation of the Pearson's r correlation coefficient. Three classes of significant r values are represented. $0.55 < r \leq 0.60$: light lines; $0.61 < r \leq 0.70$: middle lines; $r > 0.70$: heavier lines. All these values are significant at the 0.1% threshold.

related with MCN. This subset is not related to the other odorants. The second network involves cycloketones of intermediate mol. wt. (UDN, CDN, CNN). It must be noted that this group presents strong relationships with the CAM-IBO pair and has looser links with the third subset of cycloketones through CHN.

It is worth considering in more detail the values of the r coefficient between the different cycloketones and the CAM-IBO pair. It can be seen in Figure 4 that CAM and IBO display very similar relationships with cycloketones. The shape of the curves indicates that the similarity between cycloketones and camphoraceous compounds increases with the number of C atoms, reaches a maximum for C_9 – C_{11} and decreases with further enlargement of the carbon ring.

The lightest cycloketones, CPN, XON and CHN display significant correlations with PIN, and CPN is well correlated with the d-forms of both enantiomers, DCA and DCI. Finally, only one compound, CAQ, remains isolated from the other odorants.

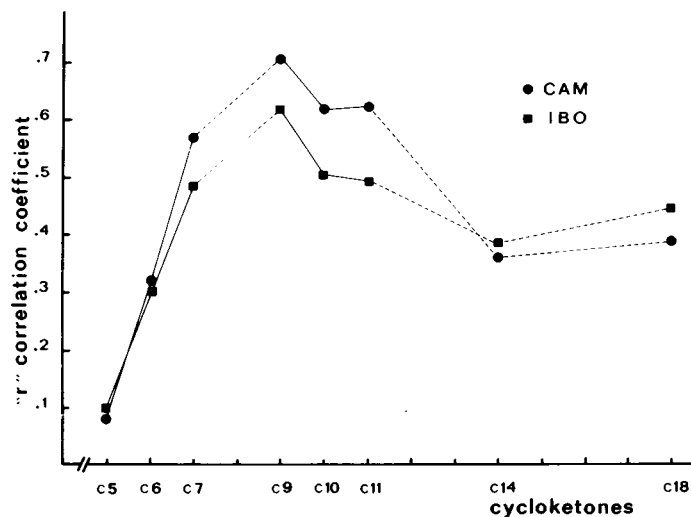


Fig. 4. Study III: r correlation coefficient between different cycloketones, and CAM and IBO.

Figure 5, the diagram referring to Study IV, shows that the position isomers QUI and IQI are highly correlated. Significant positive values are further found for the cross-relationships between MTA, MTN, TER, LIM, DMS and CYM on the one hand, and XCA and BZA on the other hand. The diagram also shows that five compounds display no significant correlation with any other compounds; they are CIN, HEX, PHE, XAN and PYL.

Factor analysis. In both studies, a large number of factors are required to represent the total variance of the original data. Among several possible ways of representing factor analysis data, we chose to represent, for each study, the factorial plans defined by factors 1 and 2 and by factors 3 and 4, separately. In order to provide a more synthetic – though partial – view of the odorant space, a three-dimensional presentation of the first three factors is also shown. It must be emphasized that factors are independent from each other and that a complete representation of the multidimensional space would be obtained only by taking all factor combinations into account. The variance associated with the first four factors reaches 61.7% in Study III and only 49.4% in Study IV. The difference is mainly related to the relative weight of the first factors that is 26.9% in Study III and 16% in Study IV.

In Study III, the odorants are presented in the planes defined by the first and the second factors in Figure 6A and by the third and fourth factors in Figure 6B. A combination of the first three factors is shown in Figure 7. The first factor is highly correlated with CAM, IBO and the heaviest cycloketones while it is negatively correlated with MAC and DPC. The second factor is positively correlated with ACE and negatively correlated with PIN. Along the third factor, the lightest cycloketones, CPN and XON are opposed to MAC and DPC. Finally, the fourth factor is mainly correlated with the cycloketones. Whatever the combination of factors considered, some of the odorants are grouped in pairs. These pairs

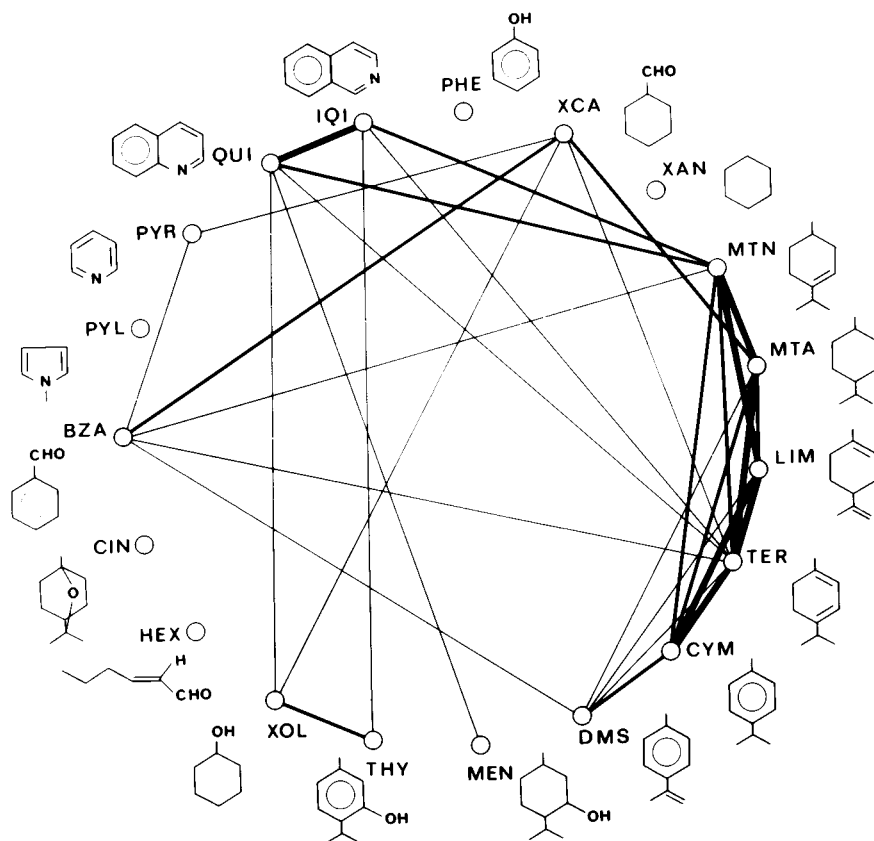


Fig. 5. Study IV: Correlations between odorants according to the calculation of the Pearson's r correlation coefficient. Three classes of significant r values are represented. $0.45 < r \leq 0.50$: light lines; $0.51 < r \leq 0.60$: middle lines; $r > 0.60$: heavier lines. All these values are significant at the 0.1% threshold.

are (i) the enantiomeric forms of citronellol; (ii) the enantiomeric forms of carvone; (iii) the isomers MAC and DPC, (iv) CAM and IBO.

There is a considerable scattering of the cycloketones in both factorial planes represented but this scattering has a certain order. In the first factorial plane (Figure 6A) it can be seen that these compounds are differently distributed with respect to axes 1 and 2. From 5 to 9 carbon atoms, they are almost exclusively discriminated by axis 1 whereas the remaining ones are solely discriminated by axis 2. Consideration of the second factorial plane provides further information (Figure 6B). The heaviest cycloketones TDN and ODN appear to be well isolated from all the other ketones with respect to axis 4. It must also be noted that the proximity of MCN with these odorants, which is visible in the first factorial plane, is fully confirmed when the second plane is considered.

Another example of the relationships between cycloketones and other odorants

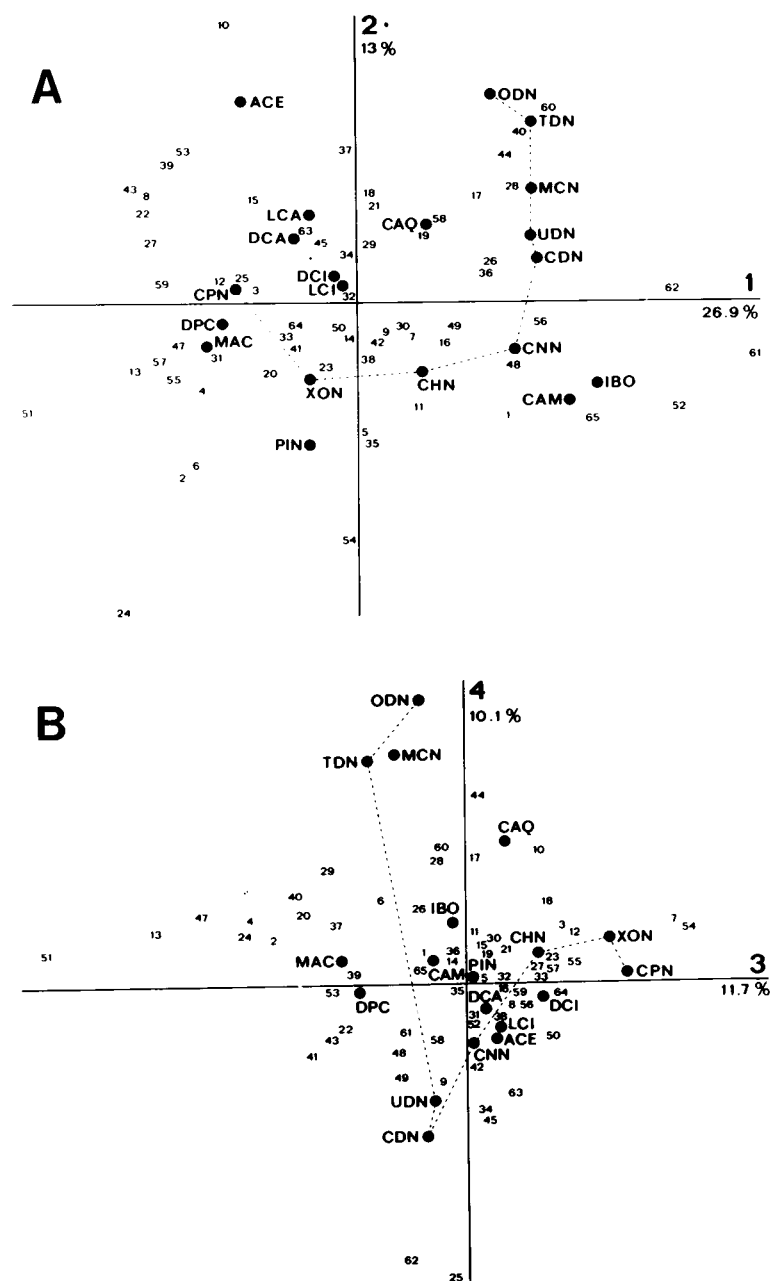


Fig. 6. Study III: Factor analysis diagrams presenting odorants along with receptor cells in the I-II axis plane (A) and in the III-IV axis plane (B). The percentage of inertia corresponding to each dimension is mentioned.

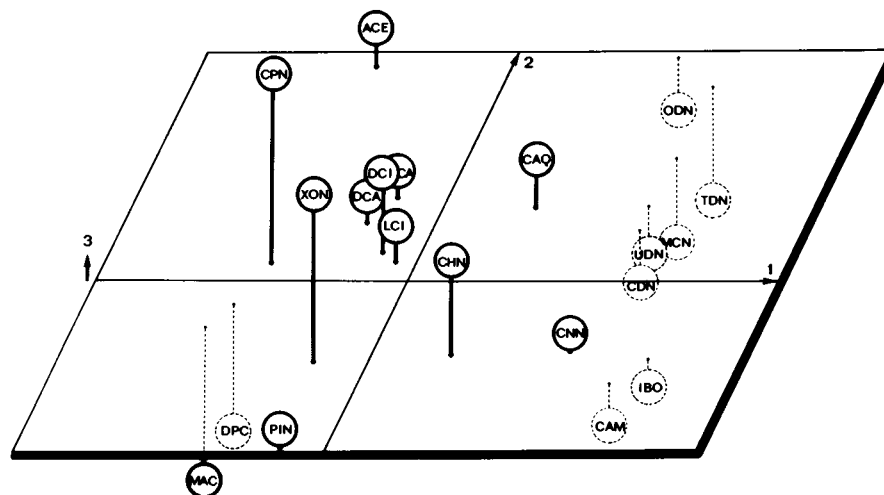


Fig. 7. Study III: A tridimensional representation of the odorants according to the data of factor analysis.

concerns the CAM-IBO pair. Considering the first four factors, it can be observed that this pair is located closer to the cycloketones of intermediate mol. wt. (C_7 , C_9 , C_{10} , C_{11}) than to any other compound.

The other compounds do not display any noticeable relationship with the cycloketones. However, one may note that the straight-chained ketones MAC and DPC are located close to the lightest cycloketones (XON, CPN) along 3 of the 4 factors represented.

CAQ appears to be well isolated from all the other odorants, even from the 'camphor group'. Finally, it is interesting to observe that ACE is, among all the compounds, the one which is the most distant from the camphor group in the first factorial plane.

Twelve of the receptor cells investigated in this study have been recorded from a single frog (frog 133, Revial *et al.*, 1982). The responses from this subpopulation were processed separately with factor analysis. Figure 8 illustrates the first factorial plane. When this diagram is compared with that relating to the whole data in Figure 6A, striking similarities can be observed. For example, the lightest cycloketones are mainly discriminated by the first factor along which the CAM-IBO pair is opposed to the straight-chained ketones (MAC, DPC), to CPN, and to the aromatic compound ACE. CNN is still located close to the camphoraceous compounds. The second factor is mainly correlated with ACE. The main differences are found in the position of CAQ and that of the heavy cycloketones: the former compound is not discriminated from camphor; the latter ones provoked no responses from the 12 receptor cells and their location is determined by the spontaneous activity only.

Factor analysis data relating to Study IV are depicted in Figure 9. The first factor is highly correlated with CIN, which is opposed to PYR, XCA and BZA, the second factor being correlated with LIM, TER and CYM. The third factor is

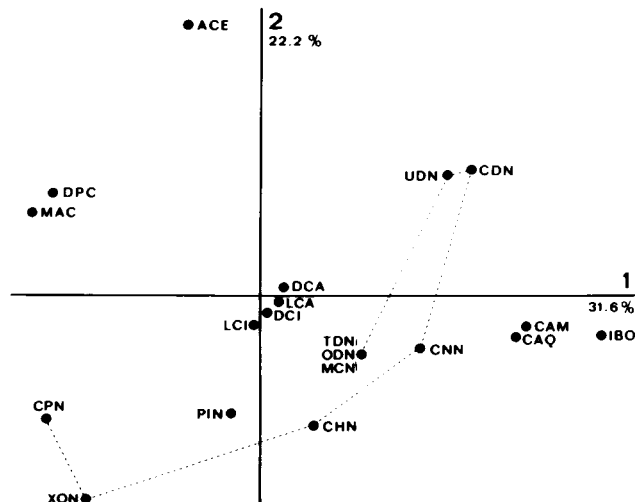


Fig. 8. Study III: Factor analysis diagram obtained by separately processing the data from 12 receptor units recorded in a single frog.

positively correlated with HEX and negatively correlated with XOL. Finally, the fourth factor is highly correlated with MEN only.

A combination of the first three factors is also shown in Figure 10. Consideration of the relative position of the compounds with respect to each of the four axes leads to individualizing the QUI-IQI pair and a cluster involving CYM, LIM, TER and DMS. MTN and MTA seem to be closely related to these compounds so that the whole cluster may tentatively be called 'terpene group'. Several compounds, CIN, HEX, MEN and PYR display no preferential relationship with any odorant of the sample. The most isolated one is CIN.

Evaluation of similarities between receptor cells

The r correlation coefficient was calculated for all pairs of receptor cells involved in each study. The values of this coefficient were found to be distributed in a wider range than those characterizing the odorant pairs (Figures 3 and 5). Some pairs formed by selective receptor units sensitive to the same unique odour stimulus reached highly significant positive values of the r coefficient. A few less selective receptor cells were also found among the highly correlated pairs. If one exclusively considers those receptor cells displaying exactly similar response profiles in qualitative, all-or-none terms, only three receptor cells could be retained in Study IV; they responded to CIN. A greater number of identical response profiles were observed in Study III. Three receptor cells responded to all 20 compounds. Six pairs of units presented more selective profiles involving responses to 6, 11, 14 (2 pairs), 15 and 16 stimuli, respectively. Finally, two further profiles were found to be exhibited by two groups of three receptor cells responding to two and three compounds, respectively. The Benzecri's method of factor analysis used in these studies allows one to represent receptor cells and odorants in the



B

188

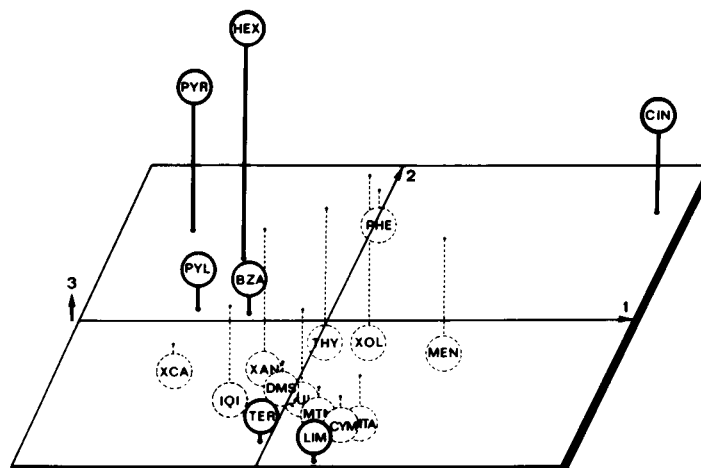


Fig. 10. Study IV: A tridimensional representation of the odorants according to the data of factor analysis.

from the cloud of points. These are very selective receptor units responding to a very small number of odorants. For example, in Figure 9A, units 1, 3 and 25 which responded to CIN exclusively, lie in a quite peripheral position. On the contrary, unselective units are gathered in the central zone of the cloud, as exemplified by units 20, 42 and 44 which responded to 16 stimuli. Considering the relative position of odorants and receptor units it can be observed that units tend to join those odorants to which they responded preferentially. For example, in Figure 6A, units 47, 13 and 51 which displayed selective sensitivity to MAC and DPC lie close to this odorant pair. They maximally contributed to its discrimination from the other compounds. Despite these interesting observations, which are not unexpected, the analysis does not seem to reveal any exceptional feature of the receptor cell space.

Odour concentration and stimulus discrimination

Reval *et al.* (1982) reported the experimental results of a concentration study (termed Study IVc below) performed on 30 out of the 46 receptor cells involved in Study IV. These cells were submitted to additional stimulations with five of the 19 odorants delivered at a lower concentration. These odorants were BZA, CIN, XCA, LIM and PYR.

The 30 receptor cells retained in this concentration study were selected because they were still recordable after the rather long period of time needed to perform the 19 previous stimulations. This condition of unit selection introduced the possibility of a systematic bias on a functional ground. This possibility was tested by comparing the properties of the 30-cell subset with those of the 46-cell sample. Two parameters were considered, the distribution of the spontaneous discharge frequencies and the distribution of the numbers of responses per stimulus. Highly significant correlation coefficients (0.98 and 0.96) were found between the samples for both parameters and the assumption of a sampling bias was rejected.

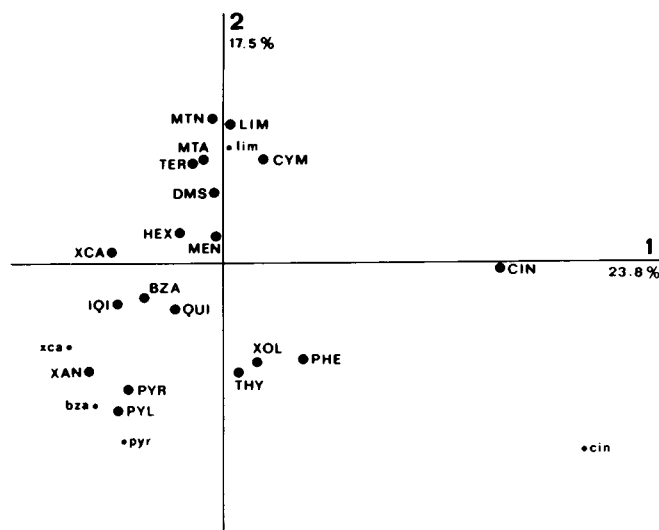


Fig. 11. Study IV: Factor analysis diagram with additional results obtained with a lower concentration (small letters) for five of the odorants.

The incidence of changing odour concentration on odorant discrimination was first evaluated by calculating the r correlation coefficient between response profiles elicited by two concentrations of a same odorant. The following values were obtained; 0.49 (BZA); 0.47 (CIN); 0.62 (XCA); 0.75 (LIM); 0.78 (PYR). Three concentration pairs reached the significance threshold at 0.1% (XCA, LIM and PYR) and two pairs (BZA, CIN) at the 1% threshold.

Further investigations were made using factor analysis. For this processing, the responses of the 30 receptor cells to the five additional stimulations were grouped with those of Study IV. The first factorial plane is represented in Figure 11.

The first factor is highly correlated with the highest concentration of CIN, as in Study IV, and also with the lowest one. Along this axis, these stimuli are opposed to both concentrations of BZA and to XCA. The second factor is highly correlated with LIM, as it is in Study IV. LIM and CYM are opposed to both concentrations of PYR along this axis. The distribution pattern of the odorants in this plane is not markedly different from that observed in Study IV (Figure 9A). In particular, the 'terpene group' is still present. It includes both concentrations of LIM. As for the other concentration pairs, it can be noted that they are poorly discriminated by the first axis and much more so by the second one. With the exception of LIM, the lower concentrations are found in a more peripheral position than the corresponding higher ones, which indicates an increase in discrimination. If one takes into account factors 3 and 4 (not represented here) in addition, the two concentration pairing is quite clear for LIM and fairly good for CIN and PYR. It is more questionable for XCA and for BZA.

Discussion

The findings reported in the present study are based upon mathematical process-

ing of electrophysiological responses recorded from receptor cells. Each response was expressed by a single number which represents the maximum frequency of the spike discharge following odour stimulation. It may be argued that representing the structure of a spike train by a single number leads to a considerable reduction of the information contained in the receptor responses. However, calculations require such a reduction. The choice of the maximum frequency has been discussed elsewhere (Revial *et al.*, 1978a). This choice is based upon the assumption that this parameter is well correlated with the amplitude of a primary event, the receptor/generator potential elicited in the receptor cell by the odorant action. This assumption is strongly supported by a recent study (Trotier and MacLeod, 1983).

Several of the findings reported above are in agreement with some of the conclusions drawn from previous series of experiments made according to the same line of investigation (Study I, Duchamp *et al.*, 1974; Study II, Revial *et al.*, 1978a,b). Firstly, the multidimensionality of the interactions between olfactory stimuli and receptor cells is unquestionably illustrated in the present new studies. Secondly, as in previous studies, the various olfactory stimuli displayed different degrees of similarities ranging from very close relatedness to complete independence. It was again observed that the negative correlations between odorants were rare and never significant, which has implications in connection with the distribution of the receptive mechanisms among the cells. This finding indicates that the different receptor sites involved in the cell responses to odorants are able to coexist in the membrane equipment of a same receptor cell, and that no rule of mutual exclusion governs their distribution.

An interesting aspect of the comparison between the present studies and the previous ones resides in the properties of CAM and related chemicals with respect to those of other compounds. It was a dominant conclusion of Study I (Duchamp *et al.*, 1974) that CAM was the most discriminated compound, evidence of which was its isolated location far from all other odorants, and especially from those of the aromatic group. This discrimination was especially operated by the first factor. A similar observation resulted from Study II (Revial *et al.*, 1978b) which involved CAM among new odorants. In addition, CIN displayed properties resembling those of CAM, including marked discrimination from the compounds of the aromatic group. Again in the present Study III, CAM (paired with IBO) is highly correlated with the first factor and maximally opposed to the single representative of the aromatic group in this study, ACE. Finally, it is again CIN that, in absence of CAM in the stimulus set, determines the first factor in the present Study IV, occupying an isolated position far from the cloud of points. These repeated findings designate the 'camphor group' as one of the most interesting classes of olfactory stimuli for approaching the subject of the physicochemical correlates of the concept of odour group. The interest for this class of chemicals is further reinforced by its well-defined olfactory quality, the camphoraceous odour, and by the existence of a specific anosmia to this odour quality (Pelosi and Pisanelli, 1981). It must also be remembered that chemical isolation of a CAM receptor protein has already been reported (Fesenko *et al.*, 1979).

Another odour group which had not yet appeared in previous studies is ap-

parent in Study IV. It includes TER, DMS, LIM and CYM which are found close to each other whatever the factorial axis considered. This group that we propose to designate as 'terpene group' is closely related to the menthane-menthene pair from which it is dissociated along the fourth axis only. A few other clusters are found in the same study, although they are less conspicuously individualized than the 'terpene group'. For example, THY, PHE and XOL remain fairly well grouped along the first four axes. Another cluster involves XCA, PYL and BZA. The presence of BZA in this cluster suggests a connection between this group and the aromatic group which was shown to include BZA in an earlier study (Duchamp *et al.*, 1974). Odorant grouping in pairs can also be observed. These pairs are easily explainable since they are formed by isomers, such as DPC and MAC in Study III and QUI and IQI in Study IV, and by enantiomers as DCI and LCI, and DCA and LCA, in Study III. Regarding the latter category of odorants, what is remarkable is not their grouping but the fact that they are distinguishable to the receptor cells. This was discussed in Revial *et al.*, 1982.

In both studies, some compounds do not significantly correlate with any other odorants. This is exemplified by ACE and CAQ in Study III. HEX, MEN, PYR and possibly XAN display this property in Study IV. In factorial diagrams their marked discrimination from the other odorants is illustrated by their location at the periphery of the cloud of points. It must be assumed that they possess original stimulating properties which are not present in the other compounds. It is likely that they represent other original odour groups. This is verified for ACE which was grouped with several benzene derivatives forming an 'aromatic group' in Study I (Duchamp *et al.*, 1974) and in a more recent study (Sicard *et al.*, 1980).

An interesting aspect of the findings obtained in Study III concerns the series of eight cycloketones. It is well known that these compounds display progressively different odour qualities. It is also clearly visible from calculation of correlation coefficient and factor analysis that they represent a wide range of stimulating properties, which is reflected in the dispersal of their representative points in the factorial space. It can be observed in the first place that their linear patterning in the plan defined by the first two factors (Figure 6A) is in agreement with an earlier study on olfactory bulb neurons by Døving (1966) who demonstrated that within a series of homologous substances, the relatedness in stimulative properties is greatest for neighbouring substances and gradually decreases with separation in terms of carbon number. Another notable observation is that the chain-like pattern appearing in factorial diagrams can be subdivided into several segments. The values of the r correlation coefficient confirm this distribution into three relatively distinct clusters. Two of these subsets display preferential relationships with some particular odorant or group of odorants. It is worth noting that the two heaviest cycloketones of the series, which are found in close proximity with musk ketone in both correlation calculation and factor analysis are known to possess a musky odour for human subjects. It is well known that monocyclic unsubstituted ketones with a number of carbon atoms ranging from 9 to 12 possess a camphoraceous note. A correlate of this qualitative similarity with camphor is found in the relative proximity of these ketones, and especially CNN, with the CAM-IBO pair in factor analysis diagrams (Figure 6A) and confirmed by the

calculation of the correlation coefficients (Figure 3). The proximity decreases markedly with the lightest cycloketones, which is in agreement with the fact that the camphoraceous note does not characterize these members of the series. A remarkable parallelism can therefore be established between the data provided by frog receptor cells and those pertaining to the human experience of odour qualities.

The separate processing of the responses recorded from a single preparation, resulted in a factorial space which presents notable homologies with the one obtained from the responses collected in multiple preparations. Three main conclusions may be drawn from this result. Firstly, it indicates that the overall arrangement of the multi-dimensional space is not a fortuitous property of the particular set of receptor cells investigated since an increase of the sample size does not result in any important changes in the main results. Secondly, one observes that the characteristics of the similarity patterns emerge from a relatively small number of experimental data. Methodologically, therefore, we are confident that the number of receptor cells upon which our studies are based is compatible with the requirements of a reliable sampling. Finally, the results of the separate processing suggest that the diversity of the receptive properties which are demonstrated by a heterogeneous population of receptor units does not originate exclusively in the diversity of the individuals from which the responses are collected but is present in each individual. Nevertheless, it must be noted that this conclusion does not exclude the possibility of individual variations in chemosensitivity. For example the fact that no receptor cell recorded from frog no. 133 responded to MCN, TDN and ODN is compatible with the assumption that this preparation did not possess adequate acceptor sites, even though this absence of response is more likely due to the small size of the sample of cells investigated.

Regarding the relationships between receptor cells, the present Study III brings out a result which had not appeared in earlier investigations of the same type, namely that several pairs of receptor cells presented similar profiles of responses to odorants. The fact that several of these response profiles consisted of a relatively large number of excitatory responses suggests that these similarities did not appear by chance. This might give some support to the concept of the receptor cell class, a view that we could not substantiate in our previous investigations.

The way in which we approach the discrimination of odorants raises the issue of the validity of similarity measurements based upon the use of a single and arbitrary concentration of each odorant. In principle, the specific evaluation of qualitative similarities without interference with the intensive dimension of the stimuli would require the comparison of concentration-response functions rather than responses to single concentrations. However, technical obstacles discourage current use of this method. Introducing two concentrations of five odorants in Study IV was intended to aid this evaluation.

As discussed in Revial *et al.* (1982) some receptors which responded to the highest concentration of an odorant did not respond to the lower one while the opposite was never observed. The fact that the paired concentrations of stimuli are significantly correlated indicates that these changes do not occur at random. Considering the factorial space in three out of the five cases, both paired-

concentrations could be considered as belonging to the same odour group, which is more questionable for the other two cases (BZA, XCA). It is evident that the findings do not allow us to conclude that the structure of the olfactory space is completely independent of odorant concentration. Should we infer that the results obtained with our approach are purely contingent and devoid of general meaning? We would rather think that they point out the particular properties of the odorant-receptor system in the conditions defined by the systematic use of high concentrations. In these conditions, the consequences of the differences in affinity of the odorants for the different categories of membrane receptor sites are partly counteracted by high intensity stimulation and an overall lowering of discrimination. In the light of this, it is significant that the points representing the lowest concentrations in the factorial planes are situated in a more peripheral position than those representing the highest concentrations. What is important is that the discriminative capacities, even though diminished, are far from being null, as reported above. The remaining discrimination is presumably based on the most contrasted and irreducible differences which exist between the different mechanisms of molecule recognition borne by the receptor cells.

Acknowledgements

This work was supported by grants from CNRS (GRECO 32 'Olfaction' and GIS de Physiologie Neurosensorielle). G.Sicard was supported by a Roudnitska Foundation Fellowship during the last part of this study. The authors are pleased to thank Pr M.Chastrette and Mr B.Eminet for discussing many aspects of this paper.

References

- Benzecri, J.P.: 1973, *L'analyse des Données. II. L'analyse des correspondances*, Paris, Bruxelles, Montreal: Dunod.
- Døving, K.B.: 1966, 'An electrophysiological study of odour similarities of homologous substances', *J. Physiol.*, **186**, 97-109.
- Duchamp, A., Reviai, M.F., Holley, A. and MacLeod, P.: 1974, 'Odor discrimination by frog olfactory receptors', *Chem. Senses*, **1**, 213-233.
- Fesenko, E.E., Novoselov, V.I. and Krapivinskaya, L.D.: 1979, 'Molecular mechanisms of olfactory reception. IV. Some biochemical characteristics of the camphor receptor from rat olfactory epithelium', *Biochim. Biophys. Acta*, **587**, 424.
- Pelosi, P. and Pisanelli, A.M.: 1981, 'Specific anosmia to 1-8 cineole: the camphor primary odor', *Chem. Senses*, **6**, 87-93.
- Reviai, M.F., Duchamp, A. and Holley, A.: 1978a, 'Odour discrimination by frog olfactory receptors: a second study', *Chem. Senses*, **3**, 7-21.
- Reviai, M.F., Duchamp, A., Holley, A. and MacLeod, P.: 1978b, 'Frog olfaction: odour groups, receptor distribution and receptor categories', *Chem. Senses*, **3**, 23-33.
- Reviai, M.F., Sicard, G., Duchamp, A. and Holley, A.: 1982, 'New studies on odour discrimination in the frog's olfactory receptor cells. I. Experimental results', *Chem. Senses*, **7**, 175-190.
- Sicard, G., Duchamp, A., Reviai, M.F. and Holley, A.: 1980, 'Odour discrimination by frog olfactory receptor cells: a recapitulative study', IVth ECRO Congress and VIIth Int. Sym. Olfaction and Taste, Leyden, IRL Press, Oxford, pp. 171-174.
- Trotier, D. and MacLeod, P.: 1983, 'Intracellular recordings from salamander olfactory receptor cells', *Brain Res.*, **268**, 225-237.

Research Reports

Olfactory Discrimination of Structurally Related Molecules: Receptor Cell Responses to Camphoraceous Odorants

GILLES SICARD

Laboratoire de Physiologie Neurosensorielle, Associé au CNRS, Université Claude Bernard, 43 Boulevard du 11 novembre 1918, F-69622 Villeurbanne Cedex (France)

(Accepted May 1st, 1984)

Key words: olfactory receptor cells — odour discrimination — frog — camphoraceous odorants — olfactory space

Electrophysiological investigations of the selective sensitivity of receptor cells have shown that odorants could be distributed into groups according to the profiles of responses that they elicited from a population of receptor cells. As the concept of odorant group plays an important role in the understanding of olfactory coding, an attempt was made to investigate in detail the group properties of a number of structurally and qualitatively related molecules: 1,8 cineole, DL-camphor, borneol, iso-borneol, adamantane, fenchone, fenchyl alcohol, 3,3,5-tri-methyl cyclohexanone, camphene, 1,1,2,2-tetra-bromoethane. These odorants, along with several other representatives of other odorant groups, were utilized to stimulate a set of 71 individually recorded receptor cells. Factor analysis of electrophysiological data demonstrated that the grouping of odorants with camphor could be predicted on the basis of the shape and size of the molecules. The analysis also showed that even a clearly defined odorant group such as the camphor group is not likely to be determined by a single type of receptor site.

INTRODUCTION

In an extensive investigation of the discriminating properties of olfactory receptor cells, qualitative similarities among odorants have been described through a comparison of response profiles of receptor cells^{6,12,17–20}. Some of the investigated odour molecules appeared to fit into fairly precisely delimited groups or classes. One of these groups, referred to as 'camphor group', and including camphor, 1–8 cineole and isoborneol, presented several properties which seemed to designate it as a good model for studying the basis of the similarities detected by receptor cells in the different components of an odorant group. This group was clearly discriminated from other groups and a common olfactory quality, the camphoraceous note, can be assumed to give its members a certain degree of perceptive unity.

From a physico-chemical point of view the camphor group can be characterized by the shape and size

of the molecules composing this group^{1,3,7}. A list of compounds assumed to be related to camphor in terms of odour quality has been proposed by Eminet and Chastrette⁷. We selected some of these compounds along with several odorants whose stimulating properties had been studied in former experiments^{6,12,17–20} and we used them to stimulate the olfactory epithelium of frogs during electrophysiological recordings of individual receptor cells. This investigation was aimed at submitting Chastrette's model of the physico-chemical correlates of the camphor group to neurophysiological testing, in order to explore further the concept of an odorant group on an experimental basis.

MATERIALS AND METHODS

Stimulus selection

The selection of the 20 compounds tested in the present experiment was oriented by previous results

Correspondence: G. Sicard, Laboratoire de Physiologie Neurosensorielle, Associé au CNRS, Université Claude Bernard, 43 Boulevard du 11 novembre 1918, F-69622 Villeurbanne Cedex, France.

obtained in comparable experiments and by their interpretation in physico-chemical terms^{3,6,7,17,19,20}. CIN, (1-8 cineole), DL-camphor (CAM) and isoborneol (IBO) were selected according to considerations outlined in the Introduction. The representation of the camphor group was tentatively completed with the following odorants (Fig. 1):

— borneol (BOR), fenchone (FON), fenchyl alcohol (FOL). These molecules have a bi-cyclopentane skeleton in common with CAM and IBO and it was thought that their utilization could illustrate the influence of some structural variations;

— camphene (CPE), another bi-cyclopentane bearing no polar substitute;

— adamantane (ADA), a perfectly spherical molecule whose periphery is made up of H atoms exclusively;

— 1,1,2,2-tetra-bromo ethane (TBE), also a spherical molecule but of smaller size;

— 3,3,5-tri-methyl cyclohexanone (TMC); this molecule presents two spatially dissociated properties: on the one hand, a polar function (ketone) devoid of any massive polar environment and on the other hand a roughly spheroidal and apolar area;

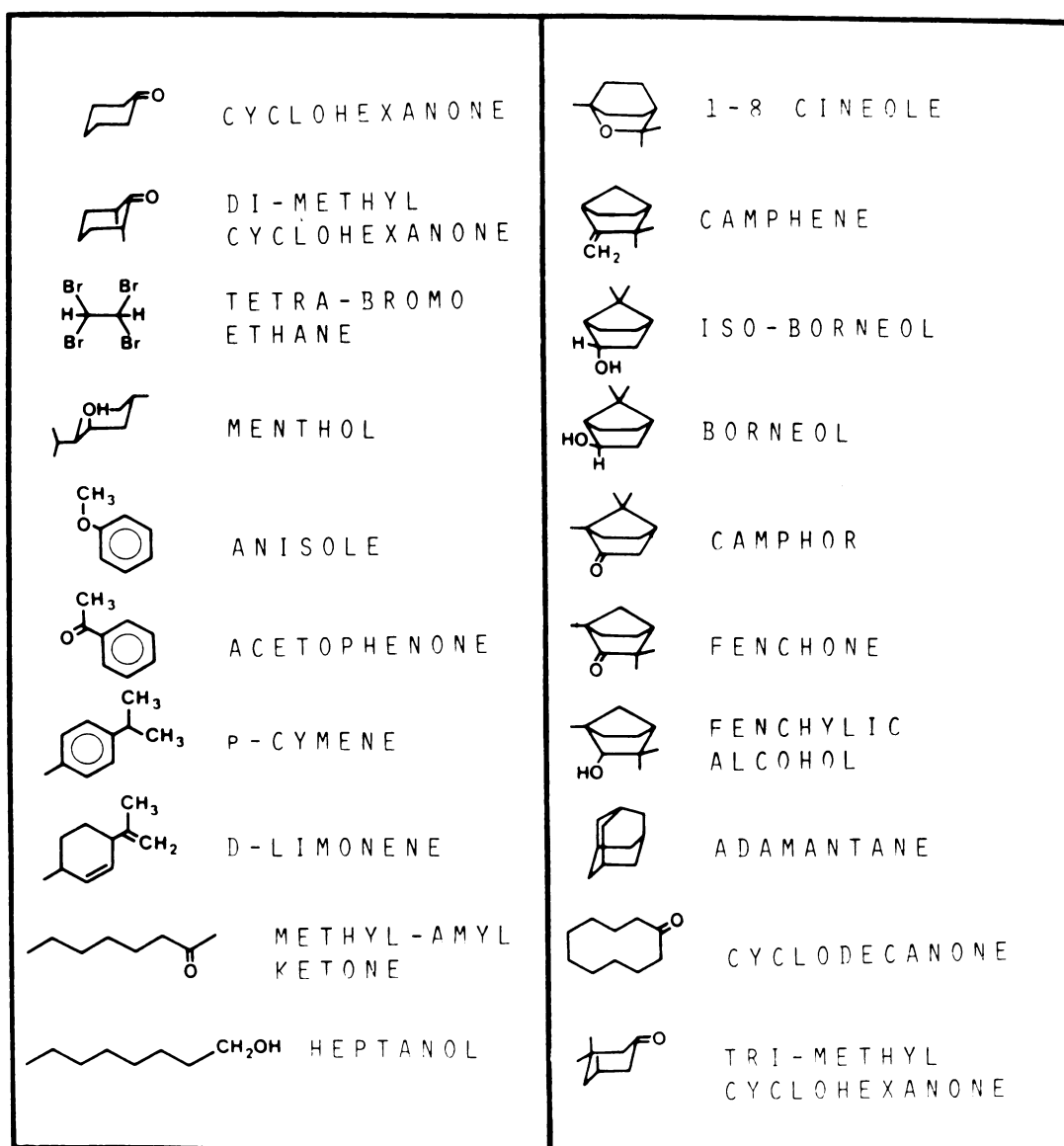


Fig. 1. Chemical structures of the odorants tested during the present study.

— 2,5 dimethyl cyclohexanone (DMC), a molecule which bears a ketone function that is less accessible than that of TMC and which is less spherical in shape.

The following odorants completed the set of odorants utilized in this study: acetophenone (ACE), anisole (ANI), cyclodecanone (CDN), *p*-cymene (CYM), heptanol (HEP), D-limonene (LIM), L-menthol (MEN), methyl amylketone (MAC). These compounds were selected because the patterns of their relationships with CIN, CAM and IBO had been investigated in our previous experiments. They were given the role of reference marks and then facilitated the comparison of the new similarity pattern with the formerly described olfactory space.

All these compounds were obtained at a high purity grade from Fluka and Merck or were provided and purified by the Laboratoire de Chimie Organique Physique of the Université Claude Bernard.

Olfactory stimulations

All selected compounds were systematically tested on all the sampled receptor cells. Stimuli were applied in gas phase to the olfactory epithelium using an olfactometer which has been presented elsewhere, along with a detailed description of the stimulation and recording procedures²⁰. Each stimulation was applied by pneumatically switching an odorized gas flow from an exhaust to a continuous flow of pure air delivered at a constant rate to the preparation. As monitored by means of a flame ionization detector, the stimuli displayed reproducibility of concentration and time course. A stimulation lasted 2 s and was followed by a rest period of 90 s. The 20 different odorants were delivered in a random order which was changed at each recording session.

A single concentration of each odorant was used. This concentration was chosen in the upper range of the levels available from the olfactometer, that is about one-tenth of the saturated vapour pressure of the compounds. As previously discussed^{18,20}, a high concentration level was chosen in an attempt to maximize and hopefully standardize the interaction between the odorants and the receptor membrane. One of the limits of this choice is the risk of triggering prolonged alterations of receptor cell activity. However, this effect was not detectable in the course of the investigation. The stimulation evoked electro-olfactograms (EOG of 1–6 mV), depending on the nature of the stimulus, and on the preparation.

Preparation and electrophysiological recordings

Experiments were carried out on 46 decerebrated and demedullated frogs (*Rana pipiens*). The access to the ventral aspect of the olfactory epithelium was obtained by resection of the roof of the nasal cavity. Preparations displaying a thick or opalescent mucus secretion were discarded. The animals were wrapped in wet gauze and kept on a holder plate maintained at 13 °C throughout the recording session. The frog holder and the microelectrode driver were firmly fixed to a vibration-proof table.

The EOG was systematically recorded as a measure of the overall reactivity of the olfactory epithelium to odour stimuli. The recording electrode was an Ag–AgCl wire connected to the epithelium through a polyethylene catheter (100 µm o.d.), filled with an Agar–Agar saline solution.

The extracellular unitary activity of receptor cells was recorded using glass microelectrodes filled with Wood's alloyage and plated with Pt-black⁹. The reference electrode was made of a chlorided silver plate wrapped in a saline-soaked gauze, inserted into the frog's mouth.

Neural activity was amplified by a low-noise, home-made amplifier, displayed on an oscilloscope, monitored with an audio system and stored on magnetic tapes. The singleness of the recorded activity was checked by inspecting spike wave forms on the oscilloscope with an expanded time base.

Receptor responses were analyzed off-line. The spontaneous activity was quantified by averaging the discharge rate in all the 10-s periods of spike recordings preceding the 20 stimulations delivered at each recording session. The response was quantified in terms of maximum firing rate as computed on the basis of the shortest series of 3 successive spike intervals found in the initial phase of the response discharge.

RESULTS

General properties and selectivity of receptor cells

Seventy-one receptor cells were investigated throughout the entire sequence of stimulations. Fifty-seven of them responded to one or several of the 20 odorants. Spontaneous activity and response time-patterns were not found to exhibit properties different from those described in former studies carried out in similar conditions^{6,16–20}. Fig. 2 presents

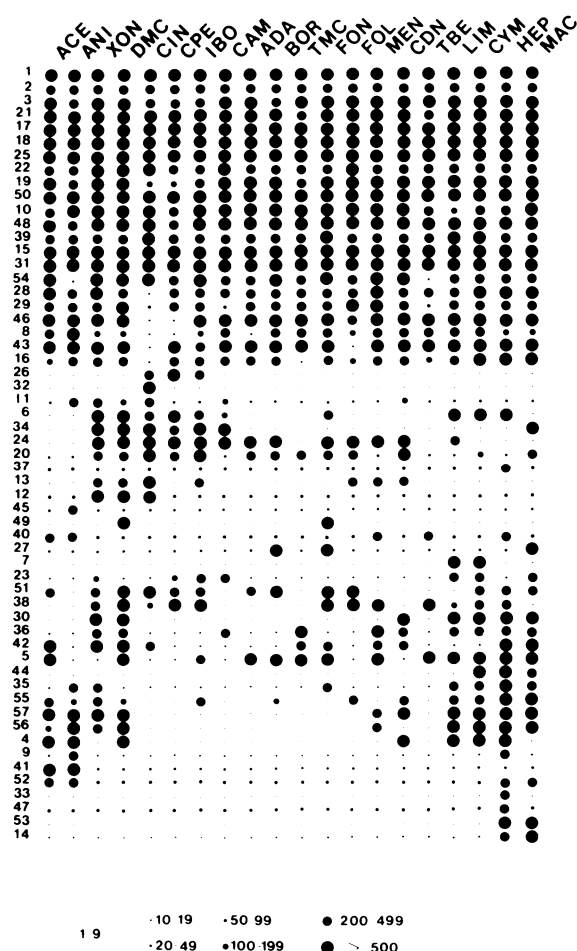


Fig. 2. Receptor cell responses to odorants. The spot size is roughly proportional to spike frequency ($\text{spike} \cdot \text{min}^{-1}$). Receptor cells are identified by a serial number in left column.

the activity of 57 receptor cells which displayed at least one response and Fig. 3 shows the distribution of all recorded receptors as a function of their individual rate of responses. Out of a total of 1420 stimulations, 635 (45%) elicited a response. This percentage is higher than those usually reported in former studies^{6,16,18,20}. In spite of rather high concentration levels used in this study, and leading to a high response score, most of the individual receptor cells displayed a selective sensitivity, and some of them were very selective. For example, units 33 and 47 responded to heptanol exclusively; while unit 32 responded to cineole only. However, several receptor cells were completely unselective. An interesting case is that of cell 28 which responded to all odorants except cineole. This case illustrates the high degree

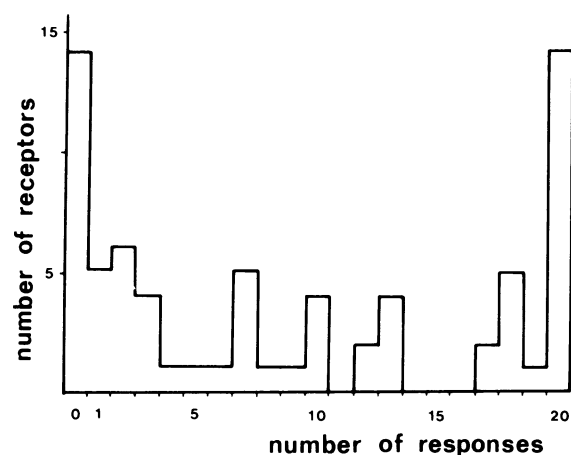


Fig. 3. Distribution of studied receptor cells according to their numbers of responses.

of specificity of the stimulating action of this substance.

Spatial distribution of olfactory sensitivity

The recording site of each receptor unit investigated was carefully plotted on a drawing of the ventral aspect of the olfactory epithelium. As can be seen in Fig. 4, these sites are distributed all along the

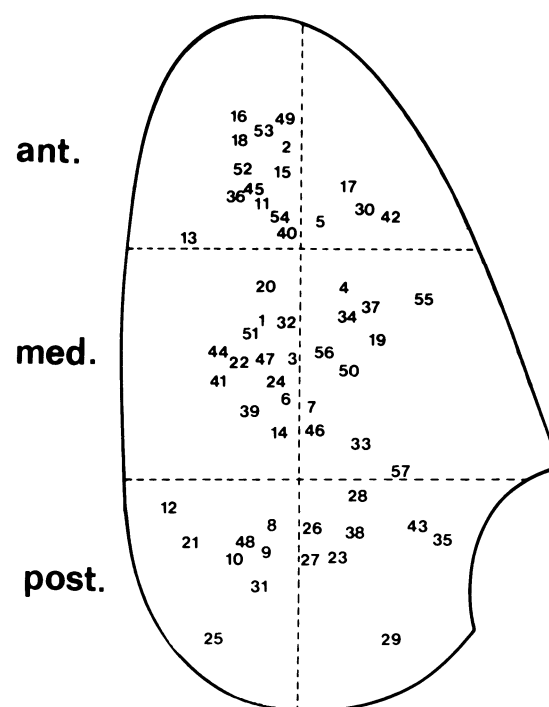


Fig. 4. Schematic representation of location of receptor cell recording sites. Receptor cells are identified by the serial numbers.

TABLE I

Distributions of responses to odorants along the antero-posterior axis of the olfactory mucosa

Three areas, as depicted by Fig. 4, have been considered.

Odorants	Numbers of cells responding to specified odorants		
	Ant.	Med.	Post.
ACE	10	13	9
ANI	9	12	11
XON	11	15	13
DMC	13	16	12
CIN	8	11	8
CPE	6	10	10
IBO	8	13	11
CAM	8	10	9
ADA	7	10	8
BOR	7	11	11
TMC	8	9	9
FON	9	11	12
FOL	7	11	9
MEN	11	10	10
CDN	11	12	9
TBE	7	7	9
LIM	9	14	12
CYM	9	16	12
HEP	13	18	12
MAC	12	15	12

rosto-caudal axis of the represented area. This area was subdivided into 3 zones, anterior, medial and posterior. The distributions of the different sensitivities in these 3 subdivisions (Table I) were compared using the χ^2 -test. They were not found to be significantly different.

Odorants compared in pairs

On the assumption that olfactory sensitivities are distributed at random among receptor cells, the theoretical probability of observing responses to two stimuli A and B in the same receptor cell is:

$$P_r(A B) = \frac{nA \times nB}{N^2}$$

when nA = number of responses evoked by A in a population of receptor cells; nB = number of responses evoked by B; and N = number of receptor cells tested.

For each pair of odours we tested whether the observed occurrence of joint responses differed from theoretical prediction, using the χ^2 test. The cases of significant differences between observation and prediction, indicating that the compared odorants dis-

play some similarity in stimulating action, are symbolized in Fig. 5.

A significant relationship is noted between CYM and LIM compounds, which were introduced in the odorant set as representatives of the 'terpene group'. Likewise, ANI and ACE representing the 'aromatic group', exhibit a significant link. Among odorants introduced on the assumption that they were related or belonged to the 'camphor group', a dense network of significant links is found. MEN, XON and TBE display several connections with this network. CIN appears to be relatively isolated since it is related to CPE and FOL only.

Multidimensional representation of relationships among odorants

A more synthetic view of the relationships among the tested odorants was obtained using 'analyse des correspondances'² to process the table of response data (Fig. 6). This analysis is based on the comparison of association profiles between variables (odorants) and observations (receptor cells). Each odorant is represented by a vector in the constructed hyperspace, and the pattern of vector positions reflects the pattern of similarities and differences among odorants.

The olfactory space constructed with this method is clearly multidimensional. Five factors are needed to represent 68% of the total variance contained in the original data, and no factor is markedly predomi-

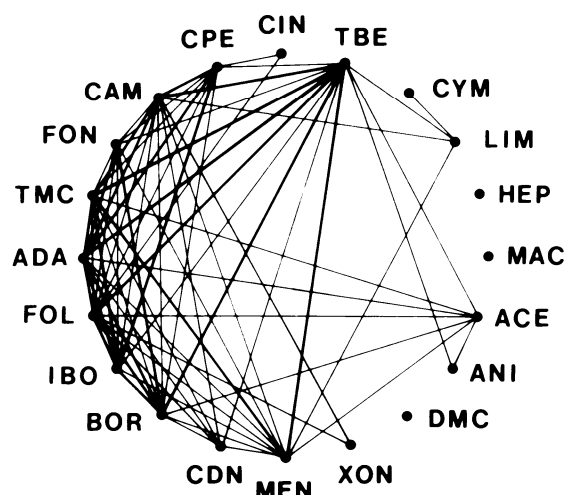


Fig. 5. Representation of χ^2 -values between pairs of odorants according to the sensitivity patterns of the neuroreceptor cells. Light lines: $P < 1\%$; heavy lines: $P < 0.1\%$.

nant over the others. Factor 1, bearing 27% of the variance opposes CIN to HEP and MAC. Factor 2 bears 14% of the variance, and opposes molecules with an aromatic ring to CIN and HEP. Factor 3 represents 12% of the variance. Along this factor, two pairs of odorants are individualized: CYM-LIM and DMC-XON.

Although a complete description of the olfactory space would necessitate taking into consideration all possible combinations of significant factorial axes, the consideration of the first 3 factors (factors 1, 2 and 3) only leads to identifying odorant groups already shown in prior experiments: the 'aromatic group': ACE and ANI; the 'terpene group': CYM and LIM; and the 'heptanol group': HEP and MAC.

Several odorants introduced as possibly related to the 'camphor group' are found in a cluster including CAM. They are: CPE, ADA, BOR, IBO, FON, FOL and TMC. This cluster does not include CIN. Even though it is markedly isolated, this odorant is located in the same region of the olfactory space as the 'camphor group'. MEN, CDN and TBE are found not far from the 'camphor group'. XON is paired with DMC and is quite distinct from both CIN and HEP.

Taxonomic analysis of odorant similarities

The odorant groups tentatively individualized from the observation of the factorial representation were further investigated using a method of automatic data classification. Derived from a principal component analysis, the non-hierarchical, descending taxonomy developed by Fages (TAXI program)⁸, carries out successive partitioning of elements (i.e. odorants) into a progressively increasing number of classes (descending algorithm). For each level of partitioning, the splitting is optimal when the sum of the in-class dispersions is minimal. The in-class dispersion is defined as the sum of the distances between each element of the class and its centre of gravity. The total dispersion is made minimal by means of inter-class transfers. A new class is obtained by splitting the most dispersed class of the preceding taxonomic level; however, minimizing dispersion may lead to the transfer of an element from one class to another (non-hierarchical algorithm).

Table II represents the first 8 taxonomic levels obtained with this method. Several classes of levels 7 and 8 are similar in composition to some of those established in previous studies which involved some of the same compounds (HEP-MAC; LIM-CYM;

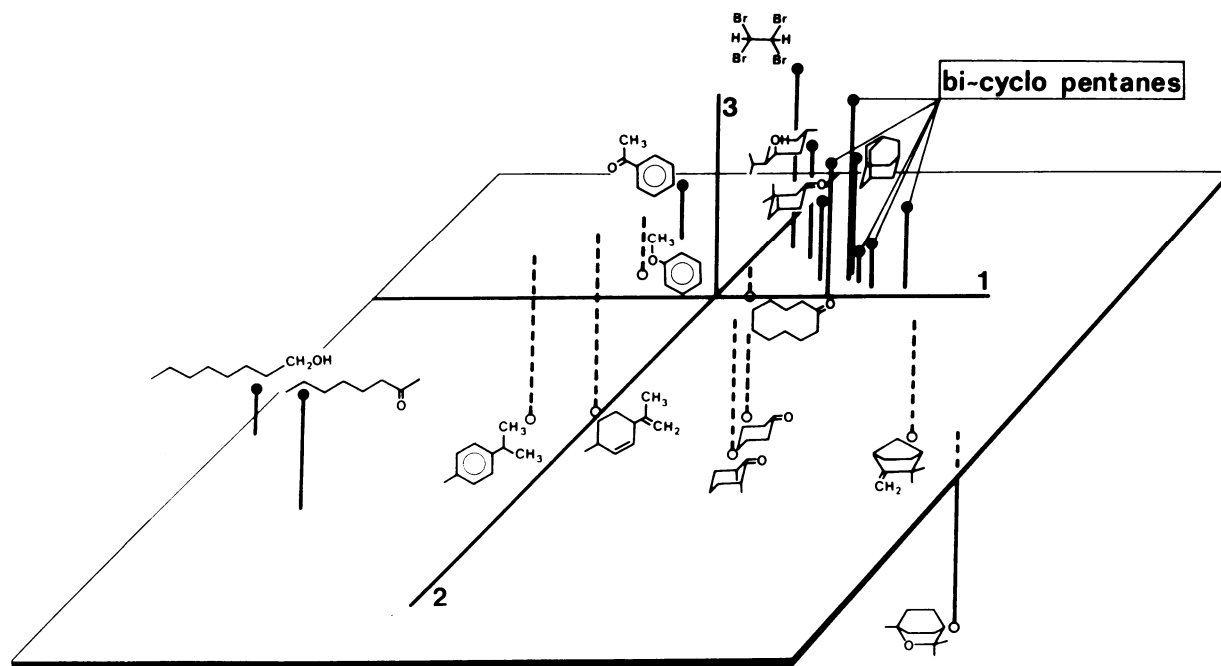


Fig. 6. Three-dimensional mapping of the whole odorant set in the space defined by factors 1, 2, 3 derived from factor analysis. This representation includes 53% of the total variance.

TABLE II

Distributions of the odorants into classes derived from non-hierarchical descending taxonomy

Eight successive steps of the analysis are represented.

<i>Level</i>								
<i>1</i>		<i>2</i>	<i>3</i>	<i>4</i>	<i>5</i>	<i>6</i>	<i>7</i>	<i>8</i>
<i>n</i> -heptanol	(HEP)	HEP	HEP	HEP	HEP	HEP	HEP	HEP
Methyl-amyl ketone	(MAC)	MAC	MAC	MAC	MAC	MAC	MAC	MAC
D-limonene	(LIM)	LIM	LIM	LIM	LIM	LIM	LIM	LIM
<i>p</i> -cymene	(CYM)	CYM	CYM	CYM	CYM	CYM	CYM	CYM
Acetophenone	(ACE)	ACE	ACE	ACE	ACE	ACE	ACE	ACE
Anisole	(ANI)	ANI	ANI	ANI	ANI	ANI	ANI	ANI
Cyclodecanone	(CDN)	CDN	CDN	CDN	CDN	CDN	CDN	CDN
2,5-dimethyl cyclohexanone	(DMC)	DMC	DMC	DMC	DMC	DMC	DMC	DMC
Cyclohexanone	(XON)	XON	XON	XON	XON	XON	XON	XON
1-8-cineole	(CIN)	CIN	CIN	CIN	CIN	CIN	CIN	CIN
Fenchyl alcohol	(FOL)	FOL	FOL	FOL	FOL	FOL	FOL	FOL
Camphene	(CPE)	CPE	CPE	CPE	CPE	CPE	CPE	CPE
Iso-borneol	(IBO)	IBO	IBO	IBO	IBO	IBO	IBO	TBE
DL-camphor	(CAM)	CAM	CAM	CAM	CAM	CAM	CAM	CAM
3,3,5-trimethyl cyclohexanone	(TMC)	TMC	TMC	TMC	TMC	TMC	TMC	TMC
Adamantane	(ADA)	ADA	ADA	ADA	ADA	ADA	ADA	ADA
Borneol	(BOR)	BOR	BOR	BOR	BOR	BOR	BOR	BOR
Menthol	(MEN)	MEN	MEN	MEN	MEN	MEN	MEN	MEN
Tetra-bromo ethane	(TBE)	TBE	TBE	TBE	TBE	TBE	TBE	IBO
Fenchone	(FON)	FON	FON	FON	FON	FON	FON	FON

ACE-ANI)²⁰. The non-hierarchical classification is in agreement with the groupings suggested by the 'analyse des correspondances'. It shows a marked cohesiveness among the compounds supposedly related to CAM, but emphasized the peculiarity of CIN with respect to the other camphor-like odorants.

The camphor group

The findings described above confirm the individuality of the camphor group within a multidimensional space. In these conditions, this group is mainly defined by the relationships between its components and the other tested odorants.

We wanted to find out whether intra-group relationships could be described with a simpler system of factors. The fraction of the original data table relating to the responses to ADA, BOR, IBO, CPE, CAM, CIN, TMC, FON and FOL was submitted to additional analyses (Fig. 7). As expected, the new space of the intra-group relationships needed a number of dimensions smaller than the number needed to represent the 20 odorants. However, no axis appears to be predominant over the others. The first 3 factors account for 69% of the total variance. Factor 1 is mainly characterized by the opposition between CIN

and all other 'camphoraceous' compounds. None of these 3 factors seems to be significantly associated with an insensitive dimension, i.e. no factor arranges the odorants according to the number of responses that they evoked or according to the mean magnitudes of these responses. We verified that withdrawing CIN from the analysis did not result in a more easily interpretable factorial space.

DISCUSSION

Receptor cell selectivity and odour concentration

On average, almost one in two stimulations elicited a response among the population of 'responsive' neurons. This rate of response is high when compared with values reported in previous studies^{6,16,18,20}. Two explanations which are not reciprocally exclusive may be put forward. First, the higher response rate may result from a relative increase in the odour concentration levels used in the present experiment. This assumption would be in conformity with earlier reports of a decreased receptor cell selectivity associated with an increase in stimulus concentration^{10,18}. Second, the high response rate may result from specific properties represented by the odor-

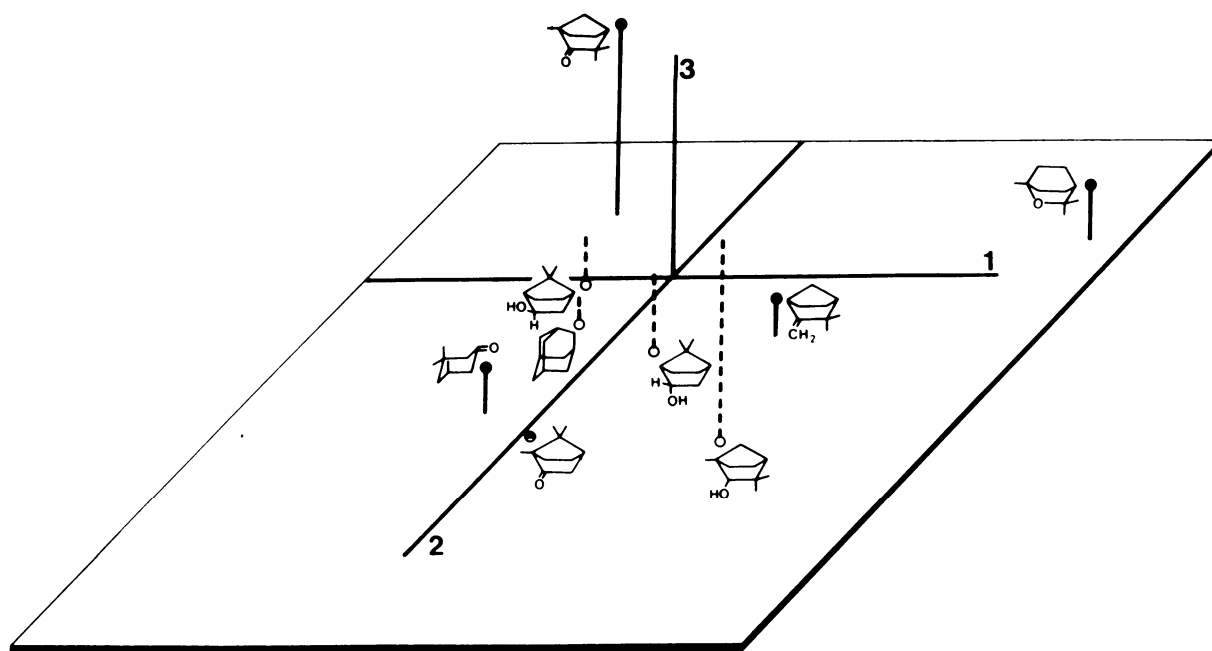


Fig. 7. Three-dimensional mapping of the camphoraceous odorants in the space defined by factors 1, 2, 3 derived from factor analysis. This representation includes 69% of the total variance.

ants tested in this experiment, and especially the group of presumed camphor-like odorants. A direct comparison with other relevant findings is possible because 11 out of the 20 odorants tested in the present experiment had been utilized in a previously reported study²⁰. Fig. 8 shows the histogram of the distributions of the 71 receptor cells investigated, as a function of the number of their individual responses to the 11 selected stimuli. In comparison, the second histogram shows the distribution of 74 receptor cells tested with similar odorants in the earlier experiment. The two distributions do not differ significantly (χ^2 test). However, the percentage of responses is higher (48%) in the present experiment than in the preceding one (41%). The increased percentage appears to involve specifically the class of unselective receptors which was doubled. It seems, therefore, that the reduction in selectivity noted in this experiment when compared with prior findings is ascribable to increased stimulus concentration.

The observation that increasing odour concentration essentially resulted in increasing the proportion of receptor cells responding to all stimuli raises the question of whether receptor cells are subdivided into two functionally different categories. A recent report by Gesteland et al.¹¹ indicates that, in the de-

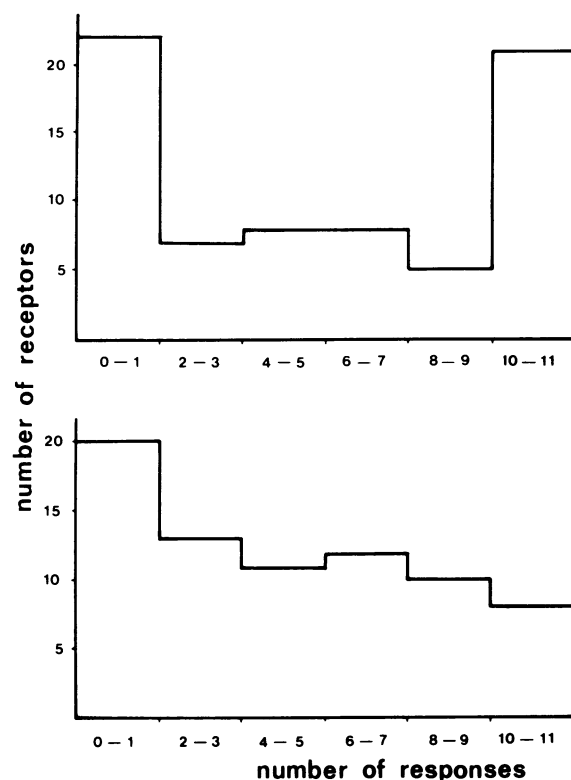


Fig. 8. Distribution of receptor cells according to their numbers of responses to the same 11 odorants used in two independent experiments: upper histogram: present study; lower histogram: previous study.

veloping rat, maturing receptor cells are unselective until they make synaptic contact with the olfactory bulb. Bearing in mind that, in the frog, receptor cells have been reported to undergo a continuous turnover, it could be suggested that the unselective cells that we found might represent a category of immature neurons. The spatial distribution of these neurons in the ventral epithelium appears to be homogeneous. We found no additional indications in the data which could support the view that odour detection mechanisms operating in these neurons work differently from those operating in more selective receptors.

Spatial distribution of olfactory sensitivities

Several investigations carried out using the EOG recording method have shown that different types of olfactory sensitivities were differently distributed across the neuroepithelium^{4,13,14,21}. Apparently, our findings obtained with the single unit recording method do not lead to a similar conclusion. No indication was found that receptor cell selectivity profiles were influenced by the location of the recording site. However, this result does not strongly argue against the chemotopological hypothesis. The sample of single cells tested is much smaller than the populations of receptors contributing to EOG signals, and it is possible that the failure of the test to show any significant site-related sensitivity resulted from the small size of the sample. Furthermore, the antero-posterior subdivisions of the epithelium, which were exclusively considered, might not be the most appropriate to the demonstration of a spatial disparity. What is clearly indicated by our findings is that the regional specialization of the olfactory epithelium which is shown by EOG findings must be understood as the expression of local increased representation of some receptor cell sensitivities, and not as a complete segregation of these sensitivities.

The noticeable stability of the pattern of relationships between odorants, as repeatedly described in several experiments carried out with the same aim^{6,17,19,20}, enables us to assimilate to the previously described 'camphor group' the cluster of supposedly camphoraceous molecules introduced in the present study. Although clearly discriminated by receptor cells, these molecules manifest more similarity to one another than to any other odorants. Structural differ-

ences among these molecules, in particular various substitutions of the bi-cyclopentane skeleton, are not sufficient to cause dislocation of the group. The spherical, unreactive molecule of adamantane belongs to this group. Whereas tri-methyl cyclohexanone, which possesses a hemispherical and apolar part, also belongs to the group, this is not the case for di-methyl cyclohexanone. It seems, therefore, that the inclusion of a molecule in the camphor group does not require the ability of this molecule to establish a polar link with receptors. This observation is in agreement with earlier suggestions that global molecular descriptors such as size and shape play a major role in determining the grouping of this particular category of odorants^{1,3,7}. However, there is no experimental evidence that this interpretation might be extended to all categories of odorants.

The marked individualization of CIN with respect to the camphor group is an unexpected finding. In several earlier studies^{19,20}, CIN appeared to be paired with CAM. The present study shows CIN to be more distant from the non-camphoraceous odorants than is the camphor group itself, and it is located in the same zone of the olfactory space as this group. Several studies have suggested that CIN could be the best representative of the camphoraceous character, either from a psycho-physical¹⁵ or a physico-chemical⁷ point of view. Recently, using a photoaffinity labelling approach, Delaleu and Holley (1983) were able to differentially modify the sensitivity of the olfactory epithelium. The treatment which altered the responses to aromatic compounds left the responses to CAM relatively unmodified. Interestingly, the responses to CIN were still less altered than those to CAM. This finding and our own observations do not argue against qualitative similarity between CAM and CIN but indicate that CIN presents some particularity with respect to other camphoraceous compounds. This remark emphasizes the essential difficulty facing attempts to classify odorants, i.e. that of determining the limits of the classes that they establish. Several criteria used in conjunction would be required to fix these limits with certainty. The criterion that we have retained, the responses of receptor cells, includes a certain amount of uncertainty since the sensitivity of each receptor cell cannot be completely described using the set of classes brought out by the overall analysis of the data table.

The findings indicate that the stimulating action of the odorants tested in the present study implies a plurality of independent mechanisms of odour molecule recognition. Because the set of odorants included a substantial number of closely related substances, an investigation of relationships among components of an odorant group, the camphor group, was made possible. This analysis leads to the suggestion that even within a single odorant group, several mechanisms of odour-receptor interactions are involved. In particular, the fact that the analysis failed to show clearly any arrangement of the camphoraceous molecules according to a pure quantitative dimension, suggests that the group is not determined by a single type of 'specialist' receptor. Instead, the reason for the grouping might reside in the fact that different receptor sites involved individually in the detection of the

components of the group share a particular configuration of receptive properties correlative of relevant odorant properties. It is likely that this interpretation may be extended to all odorant groups investigated to date.

ACKNOWLEDGEMENTS

This study was supported by the Centre National de la Recherche Scientifique (GRECO Olfaction and GIS Physiologie Sensorielle). The author has received personal support from the Foundation Roudnitska. We wish to express many thanks to A. Holley, M. Chastrette and B. Eminet for their valuable advice and help during the preparation of this study. The technical assistance of M. Vigouroux is gratefully acknowledged.

REFERENCES

- 1 Amore, J. E. and Venström, D., Correlation between stereochemical assessment and organoleptic analysis of odorous compounds. In T. Hayashi (Ed.), *Olfaction and Taste II*, Pergamon Press, Oxford, 1967, pp. 3-17.
- 2 Benzecri, J. P., *L'Analyse Des Données, Vols. 1 and 2*, Dunod, Paris, 1963.
- 3 Chastrette, M., An approach to a classification of odours using physicochemical parameters, *Chem. Senses*, 6 (1981) 157-163.
- 4 Daval, G., Leveteau, J. and MacLeod, P., Electroolfactogram local et discrimination olfactive chez la Grenouille, *J. Physiol. (Paris)*, 62 (1970) 477-488.
- 5 Delaleu, J. C. and Holley, A., Investigations of the discriminative properties of the frog's olfactory mucosa using a photoactivable odorant, *Neurosci. Lett.*, 37 (1983) 251-256.
- 6 Duchamp, A., Revial, M. F., Holley, A. and MacLeod, P., Odor discrimination by frog olfactory receptors, *Chem. Senses*, 1 (1974) 213-233.
- 7 Eminet, B. and Chastrette, M., Discrimination of camphoraceous substances using physico-chemical parameters, *Chem. Senses*, 7 (1983) 293-300.
- 8 Fages, R., *Séminaire I.R.I.A.*, Lyon, 1974.
- 9 Gesteland, R. C., Howland, B., Lettvin, J. Y. and Pitts, W. H., Comments on microelectrodes, *Proc. IRE*, 47 (1959) 1856-1862.
- 10 Gesteland, R. C., Lettvin, J. Y., Pitts, W. H. and Rojas, A., Chemical transmission in the nose of the frog, *J. Physiol. (Lond.)*, 181 (1963) 525-559.
- 11 Gesteland, R. C., Yancey, R. A. and Farbman, A. I., Development of olfactory receptor neuron selectivity in the rat fetus, *Neuroscience*, 7 (1982) 3127-3136.
- 12 Holley, A., Duchamp, A., Revial, M. F., Juge, A. and MacLeod, P., Qualitative and quantitative discrimination in the frog olfactory receptors: analysis from electrophysiological data, *Ann. NY Acad. Sci.*, 237 (1974) 102-114.
- 13 Mackay-Sim, A., Shaman, P. and Moulton, D. G., Topographic coding of olfactory quality: odorant-specific patterns of epithelial responsivity in the Salamander, *J. Neurophysiol.*, 48 (1982) 584-596.
- 14 Mustaparta, M., Spatial distribution of receptor responses to stimulation with different odours, *Acta physiol. scand.*, 82 (1971) 154-166.
- 15 Pelosi, P. and Pisanelli, A. M., Specific anosmia to 1-8 cineole: the camphor primary odor, *Chem. Senses*, 2 (1981).
- 16 Revial, M. F., Duchamp, A. and Holley, A., Odour discrimination by frog olfactory receptors: a second study, *Chem. Senses*, 3 (1978) 7-21.
- 17 Revial, M. F., Duchamp, A., Holley, A. and MacLeod, P., Frogs olfaction: odour groups, receptor distribution and receptor categories, *Chem. Senses*, 3 (1978) 23-33.
- 18 Revial, M. F., Sicard, G., Duchamp, A. and Holley, A., New studies on odour discrimination in the frog's olfactory receptor cells. I — Experimental results, *Chem. Senses*, 7 (1982) 175-194.
- 19 Revial, M. F., Sicard, G., Duchamp, A. and Holley, A., New studies on odour discrimination in the frog's olfactory receptor cells. II — Mathematical analysis of electrophysiological responses, *Chem. Senses*, 8 (1983) 179-194.
- 20 Sicard, G. and Holley, A., Receptor cell responses to odorants: similarities and differences among odorants, *Brain Research*, 232 (1984) 283-296.
- 21 Thommesen, G. and Døving, K. B., Spatial distribution of the EOG in the rat. A variation with odour stimulation, *Acta physiol. scand.*, 99 (1977) 270-280.

Receptor Cell Responses to Odorants: Similarities and Differences Among Odorants

GILLES SICARD and ANDRÉ HOLLEY

*Laboratoire de Physiologie Neurosensorielle, Associé au CNRS, Université Claude Bernard, 43, boulevard du 11 novembre 1918,
F-69622 Villeurbanne Cedex (France)*

(Accepted June 7th, 1983)

Key words: olfactory receptor nerve — odorant space — odour discrimination — frog

An extensive exploration of the discriminating properties of olfactory receptors cells has been conducted in our laboratory through the statistical processing of single cell responses recorded in the frog's olfactory epithelium. Similarities between odorant stimulating properties could be demonstrated by comparing the complex response profiles of receptor cells, resulting in the concept of odorant groups which depicts consistent relationships found between some odorous compounds. The recording technique limits the number of odorants which can be tested and compared within the same series of experiments. Thus, based upon previous studies we have chosen a specific set of 20 odorants whose characteristics are known but, up to this time, have not been compared in the same experimental system. These odorants were: acetophenone, anisole, *n*-butanol, DL-camphor, cyclodecanone, 1,8-cineole, *p*-cymene, D-citronellol, *n*-heptanol, isoamyl acetate, isovaleric acid, D-limonene, methyl amylketone, L-menthol, phenol, thiophenol, pyridine, thymol, cyclohexanol, cyclohexanone. The pattern of similarities between these odorants, as delineated with the aid of correlation coefficient computation, factor analysis and non-hierarchical taxonomy, confirms the reality of several odorant groups previously suggested and describes their cross-relationships. The receptor mechanisms underlying these odorant groups are discussed. Because reliable prominent features of the olfactory stimulus space can be established on an objective basis, the findings are proposed as a reference for future studies on other aspects of olfactory discrimination.

INTRODUCTION

Previous investigation of the properties of olfactory receptor cells has failed to provide a complete description of the mechanisms of odour discrimination at the periphery of the olfactory system in vertebrates. Only indirect arguments have been proposed to throw light on the nature, the specificity and the distribution of the hypothetical receptor sites which are thought to be responsible for the reception and the discrimination of olfactory stimuli^{1,6,10,12,14–17}.

Former studies have indicated that no simple relationship could be established between odorant structure and receptor cell activity. It has been demonstrated that most receptor cells respond to a large number of compounds possessing evident sterical or functional differences^{2,7,9,13,19–22}. Moreover, considering the responses of a few tens of receptor cells, it appeared that two chemicals, even as closely related as enantiomeric forms, were always discriminated without ambiguity^{21,22}.

The extensive nature of the olfactory domain, the complex sensitivity profiles of receptor cells, and the

technical limitations that researchers have encountered in performing electrophysiological recordings from individual receptor cells, have resulted in substantial difficulties in understanding olfactory discrimination. Nevertheless, we hypothesized that an extensive exploration of structure–activity relationships based on extracellular recording of numerous receptor cell responses was a reasonable approach toward the clarification of the principles governing the reception of olfactory stimuli and the neural coding of their specific quality. In particular, it was expected that a systematic research program would overcome some of the difficulties encountered when casual observations are interpreted. The first results⁷ did indeed indicate that it was possible to establish statistically significant similarities in the stimulating properties of some odorants in spite of complex combinations of sensitivity demonstrated by individual neuroreceptors. The concept of 'odorant group' was proposed in order to take account of the fact that several odorants tended to cluster when response data were analyzed for similarity by appropriate mathematical techniques.

The method of data processing needed for these investigations required exclusive utilization of complete matrices. Accordingly, only the data from those receptor cells tested with all of the substances could be retained for similarity evaluation. This requirement, along with the short life span of nerve units under experimental conditions, led experimenters to define an optimal number of different stimuli which could be systematically tested in the same experiment and to subdivide the research program into successive and independent stages⁷. Twenty odorants were investigated at each stage and 4 studies were made of the responses of receptor cells to a total of 68 different odorants. Each collection of data revealed a certain pattern of similarity and dissimilarity among the odorants and several odorant groups became evident^{7,19-22}. Because the composition of the 4 samples of odorants overlapped to a small extent, observations of a few odorants could be reproduced in independent series of experiments. For example, it was repeatedly observed that odorants smelling like camphor were maximally discriminated from stimuli of the 'aromatic group'^{7,19,20}. However, several aspects of previously reported similarities deserve to be confirmed by independent observations in a different experimental environment. This then is one of the aims of the present study. The other aim is concerned with an attempt to obtain an experimentally-based recapitulation of the main features of similarities patterns disclosed in the former separate explorations of the olfactory stimulus domain. Practically, this was accomplished by selecting 20 odorants from among the 68 which had been used in previous experiments. Selection was directed towards maximizing the diversity of chemical structures and odour qualities represented and introducing representatives of as many formerly identified groups as possible.

This paper reports the effects of the stimulation of a sample of 74 receptor cells of the frog with 20 odorants and the results of statistical analyses performed on these responses in order to determine the organization of the odorant ensemble in terms of similarity in stimulating properties. The significance of the results, and particularly the meaning of the odorant grouping is discussed. Finally, the usefulness of this approach for understanding odour discrimination at the receptor level is tentatively evaluated.

MATERIALS AND METHODS

Odorants

The 20 olfactory stimuli employed in this study were selected among the 68 odorants previously used in the 4 experiments performed by Duchamp et al. and Revial et al.^{7,18-21}. All were reagent grade chemicals obtained from Fluka and Merck or offered free by Polak's Frutal Works, Amersfoort, The Netherlands. Selection was based on a compromise between the two concurrent requirements stated in the Introduction. An attempt was made to use as many substances as possible in each odorant group and to represent as many odorant groups as possible. Thus, some groups were represented by a pair of odorants: DL-camphor (CAM) and 1,8-cineole (CIN) represented the 'camphor group'; *p*-cymene (CYM) and D-limonene (LIM) represented the 'terpene group'; anisole (ANI) and acetophenone (ACE) were chosen from the 'aromatic group'. Some other hypothesized odorant groups were represented by a single chemical: isovaleric acid (IVA), *n*-butanol (BUT), D-citronellol (DCI). Finally, a number of stimuli were selected because they had been well discriminated from other odorants in prior experiments, or because their inclusion in a defined group was supposed but required further confirmation: L-menthol (MEN), pyridine (PYR), cyclodecanone (CDN), thymol (THY), phenol (PHE), thiophenol (PHO), isoamyl acetate (ISO), methyl amylketone (MAC), *n*-heptanol (HEP), cyclohexanol (XOL) and cyclohexanone (XON) (Table I).

All stimuli were delivered to the olfactory epithelium at a concentration which may be considered as high, i.e. ranging from 5% to 33% of the saturated vapour at room temperature, depending on the stimulating effectiveness of the compounds as measured in terms of electro-olfactogram (EOG) amplitude. The reason for using relatively high stimulation intensity has been previously presented¹⁸⁻²¹ and will be further commented on in the Discussion.

Stimulation

Stimuli were applied to the olfactory epithelium using a gas dilution olfactometer (Fig. 1). Each stimulation was applied by pneumatically switching an odorized gas flow from an exhaust to a permanent air flow delivered at a constant rate to the preparation.

TABLE 1

List of odour stimuli with an estimation of their concentration in the stimulating odour flow

For several compounds the saturated vapor pressure could not be known accurately and the concentrations were not calculated.

Code	Chemical name	Stimulus intensity	
		fraction of saturated vapor pressure	concentrations ($\times 10^{14}$ molecules/ml)
ACE	acetophenone	1/5	—
ANI	anisole	1/5	180
BUT	<i>n</i> -butanol	1/10	185
CAM	DL-camphor	1/5	12
CDN	cyclodecanone	1/5	—
CIN	1,8-cineole	1/20	24
CYM	<i>p</i> -cymene	1/10	37
DCI	<i>D</i> -citronellol	1/5	—
HEP	<i>n</i> -heptanol	1/10	—
ISO	isoamylacetate	1/10	130
IVA	isovaleric acid	1/2	—
LIM	<i>D</i> -limonene	1/5	100
MAC	methyl-amylketone	1/10	33
MEN	<i>L</i> -menthol	1/3	—
PHE	phenol	1/3	—
PHO	thiophenol	1/10	76
PYR	pyridine	1/10	467
THY	thymol	1/4	—
XOL	cyclohexanol	1/10	33
XON	cyclohexanone	1/10	113

The olfactometer was made of a set of 20 independent odour channels (A) and of a delivery system. Each channel included an odorant flask, an electric valve and a needle valve connected through stainless steel and teflon tubing to a mixing chamber in the delivery system. In order to prevent odorants from possible oxidation, the odorants were stored in glass flasks under a nitrogen atmosphere. Nitrogen from a regulated pressure source was also used as a vector in the odour channels. The selection of a channel was made by operating the corresponding electric valve; the flow rate of odorized gas was adjusted by means of the needle valve.

The delivery system included three additional channels. A first channel (B) fed the mixing chamber with a rinsing flow (150 ml/min) which was also used to dilute odour-saturated nitrogen during the stimulation sessions. The other two channels (C and D) were used to control the access of the odorized flow to the preparation. Channel C, which was connected to a Venturi pump, carried an outward flow (400

ml/min) which exactly balanced an inward pure air stream flowing through channel D. Switching off the electronic valves of C and D channels allowed the content of the mixing chamber to be directed through the nozzle to the olfactory mucosa (maximum flow rate 180 ml/min). As monitored by means of a flame ionization detector the stimuli displayed a reproducible time course with rather abrupt onset and termination phases (Fig. 1).

Each stimulation lasted 2 s and was followed by a rest period of 90 s. The 20 different stimuli applied during the recording of a receptor cell were delivered in a random order which was systematically changed at each recording session. When the single neuron activity remained recordable after 20 stimulus applications some stimulations were repeated to test the reliability of the responses.

Electrophysiological recordings

Experiments were performed on 47 decerebrated and demedullated frogs (*Rana ridibunda*). Resection of the nasal cavity roof with minimal bleeding was achieved to give access to the ventral aspect of the olfactory epithelium. Animals showing a thick or opalescent mucus secretion were rejected. Frogs were wrapped in wet gauze and kept on a holder plate which was maintained at 13 °C throughout the recording session. This was reported to maintain the preparation in stable conditions for several hours⁷. The animal holder and the microelectrode driver were rigidly fixed to a vibration-proof table.

The electro-olfactogram (EOG) was systematically recorded as a measure of the overall reactivity of the olfactory epithelium to odour stimuli. The recording electrode was an Ag-AgCl electrode connected to the epithelium through a polyethylene catheter (tip outer diameter: 100 μ m) filled with an Agar-Agar saline solution.

The unitary activity of receptor cells was collected using glass microelectrodes filled with an alloy of Wood's metal (80%) and indium (20%) and electrolytically plated in a platinum tetrachloride-lead acetate solution. Such electrodes of tip diameter 1–2 μ m had impedances ranging from 1 to 4 M Ω at 1000 Hz. The common electrode, a chlorided silver plate wrapped in a saline-soaked gauze, was inserted into the frog's mouth. Neural activity was amplified by a low noise, home made amplifier (input impedance

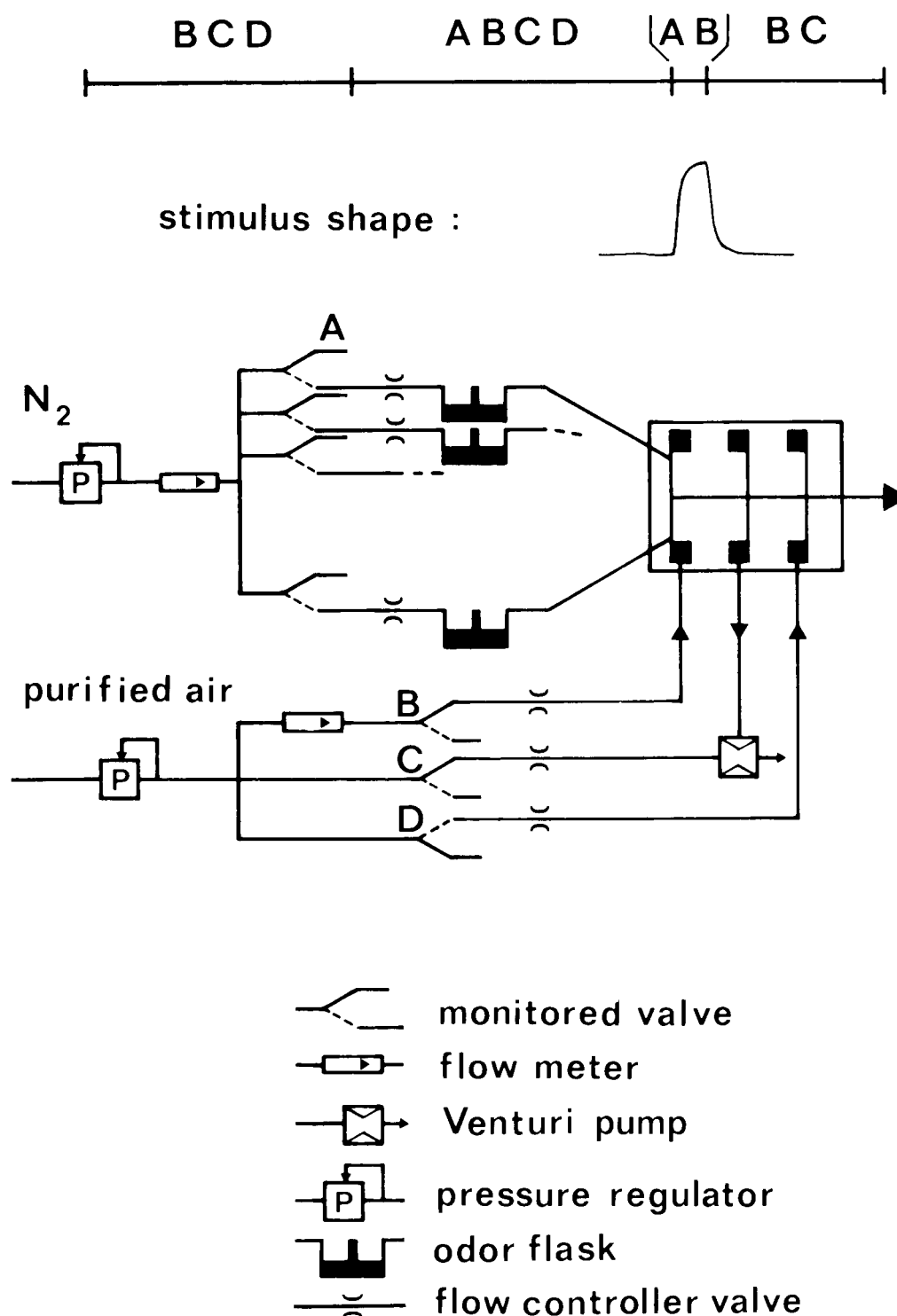


Fig. 1. Multichannel olfactometer. Upper part: stimulation sequence. Letters refer to the channels open during the corresponding phase. The 4 phases lasted 15, 18, 2 and 10 s, respectively. The shape of the stimulus as monitored by flame ionization is indicated. Lower part: schematic representation of the multichannel olfactometer. Explanation in the text.

500 M Ω ; bandwidth 300–3000 Hz), displayed on an oscilloscope, monitored with an audio system and stored on magnetic tapes for subsequent treatments.

Special attention was paid to check the singleness of each recorded activity. This was accomplished by inspecting spike waveforms on the oscilloscope screen with an expanded time base.

Quantification of neural activity

Neural responses were analyzed off-line. The tape recordings of neural impulses were transferred to a GOULD ES 1000 chart recorder. Spikes were counted by eye. The spontaneous activity was quantified by averaging the firing rate in all the 10 s periods of spike recordings preceding the 20 stimulations delivered to each receptor unit. Because the baseline firing rate was generally low, neural responses were rarely ambiguous and no statistical processing of spike-intervals appeared more suitable than visual inspection of the tracings for revealing a response to stimulation. As previously described^{19,21}, neural responses displayed different types of time patterns. In particular some responses showed an abrupt interruption of firing following a brief discharge, which has been interpreted as a result of a strong cell depolarization¹⁸. It was thought that the initial phase of the discharge, which showed similar characteristics in each type of response patterns, was a good correlate of the primary events of the stimulus–receptor interactions, even though the subsequent phases were not without information concerning the stimulus and the receptor. In contrast, with resting gates which were rather irregular, in the first stage of the response the spike intervals decreased and became regular (Fig. 2). The response was quantified in terms of maximum firing rate as computed on the basis of the shortest series of 3 contiguous spike intervals found in the rising phase of the response discharge.

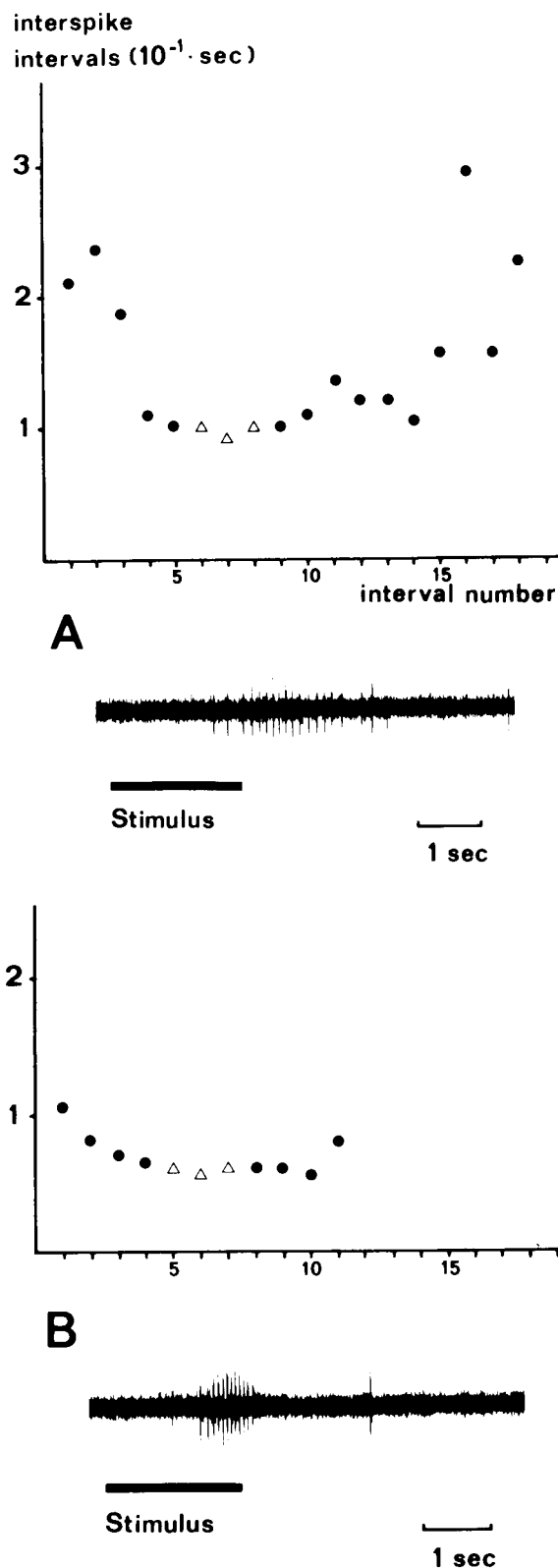


Fig. 2. Quantification of receptor cell responses. Two examples of excitatory response recordings from a receptor cell are shown along with the corresponding diagrams of interspike intervals. Triangles indicate the 3 shortest successive intervals used to estimate the response magnitude. A: sustained response; B: response with spike amplitude decrement.

RESULTS

Out of several hundred receptor units which were detected by the electrode during its slow penetration into the epithelium, 74 could be kept throughout the entire sequence of stimulations. These units displayed a low firing rate at rest. In 56% of them, the discharge frequency did not exceed 20 spikes per min. The highest frequency encountered was 120 spikes per min (Fig. 3).

Of the 1480 stimulations delivered to the recorded units, 514 (35%) were followed by an excitatory response. In two cases only, stimulation induced an unambiguous interruption of spike activity. This occurred with butanol as a stimulus. Fourteen of the recorded receptor cells failed to respond to any stimulation. Sixty units responded to at least one stimulus. The details of the responses of these 60 units is depicted in Fig. 4. It can be seen that each receptor cell displayed a unique profile of sensitivity to the 20 odour compounds. With the exception of very selective units such as unit 17 and unit 49 which responded to heptanol only, it was not possible to find two receptor units with similar response profiles.

Each odorant elicited responses from a set of receptor units. The receptor sets for various odorants overlapped each other to some extent. For example, a majority of units responding to camphor also responded to cineole. In contrast, few receptor units responding to cineole displayed a response to heptanol. The degree of overlapping between responsive unit sets can be taken as an index of similarity be-

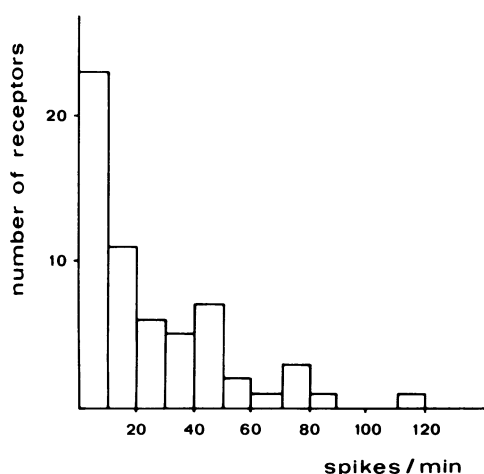


Fig. 3. Histogram of receptor cell spontaneous activity.

tween the stimulation properties of the corresponding odorants. Accordingly, camphor and cineole can be considered as more similar than cineole and heptanol, which may indicate that the odorants of the former pair, but not those of the latter one, were detected by the same type of receptive mechanisms. Because visual examination of the response table has very limited analytic validity, the investigation of further odorant similarities was pursued by mathematically processing the table of quantified responses.

Comparison of stimuli in pairs

A Pearson's ' r ' correlation coefficient was calculated for each pair of odorants based on the responses of all the receptor units tested with that pair. The distribution of the r values is depicted in the histogram in Fig. 5. Forty-one pairs of odorants were found to be significantly correlated at the 0.01 threshold. No significant negative correlation was observed at this threshold. The r mean value was 0.24, which is a value below the significance threshold; keeping in mind, in addition, that there were few negative r values, this indicates an overall independence of the stimulation properties represented in the sample of stimuli. The highest r values, all significant, are represented in Fig. 6. In the complex network of correlations, some pairs appear to be strongly associated: camphor and cineole ($r = 0.71$), D-limonene and p -cymene ($r = 0.70$), cyclohexanol and cyclohexanone ($r = 0.60$), cyclohexanol and D-citronellol ($r = 0.70$), methyl amylketone and heptanol ($r = 0.62$).

Olfactory space representation

A more synthetic view of the relationships between odorants was provided by factor analysis. In order to preserve the possibility of comparing the findings with those obtained in previous experiments with 'analyse factorielle des correspondances'³, the original data were analyzed by the Benzecri's program which compared the association profiles of the stimuli and of the receptor cells using χ^2 calculations. As utilized here, the program arranged both odorants and receptor units in a same multidimensional space. The euclidian distances between odorants in this space represent the degree of similarity of their stimulating properties (Figs. 7 and 8).

The first 5 factors represented no more than 59% of the total variance of the original matrix with a slow

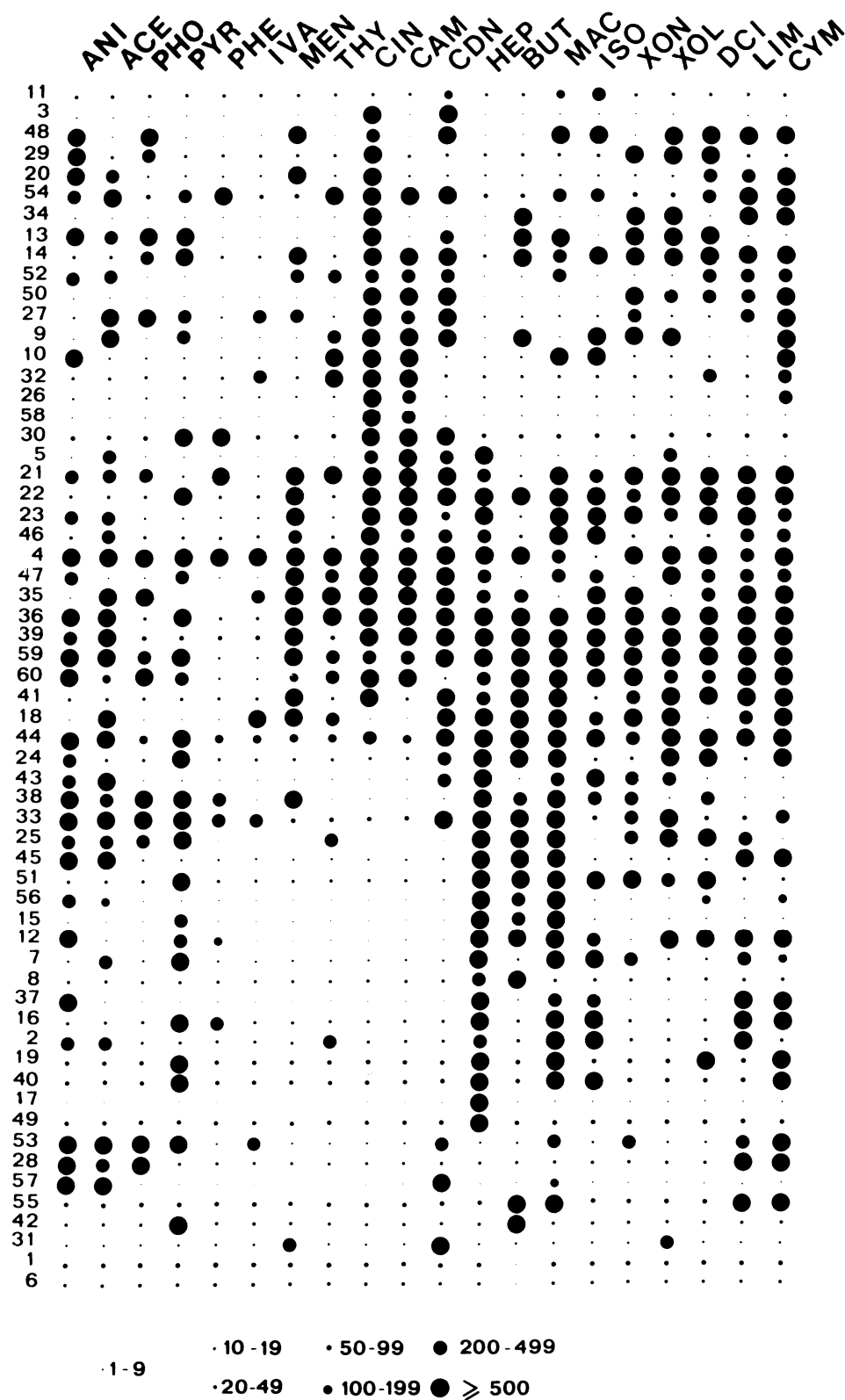


Fig. 4. Diagrammatic representation of receptor cell activity following stimulation. The spot size is roughly proportional to spike frequency (spike/min). Receptor cells are identified by a serial number in left column. Note the different distribution of the responses to cineole and to heptanol. (For abbreviations see Table I.)

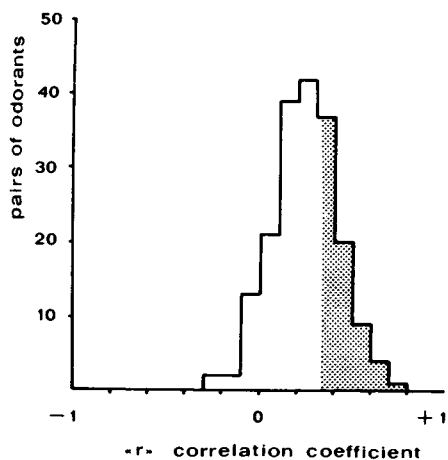


Fig. 5. Distribution of r correlation coefficient values between pairs of odorants according to the sensitivity patterns of the neuroreceptor cells studied.

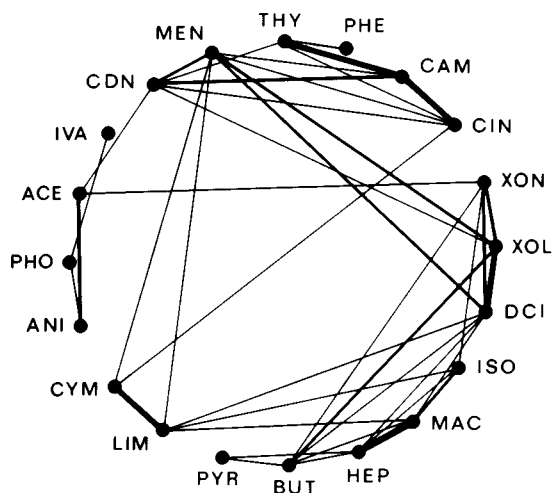


Fig. 6. Representation of the values of r correlation coefficient values significant at the 1% threshold. Light lines: $r > 0.38$; medium lines $r > 0.50$; heavy lines: $r > 0.60$. (For abbreviations see Table I.)

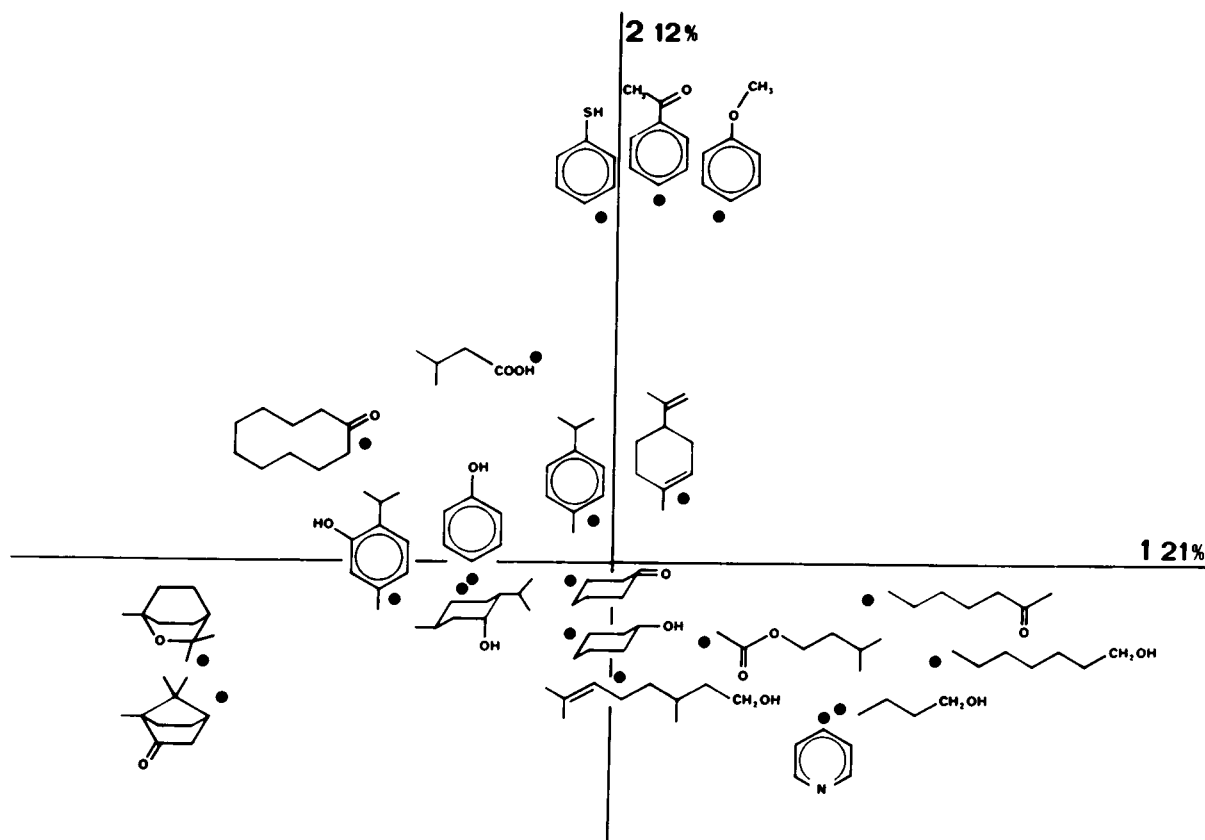


Fig. 7. Two-dimensional mapping of odorants in the space defined by the first 2 factors derived from factor analysis. This plane includes $21 + 12 = 33\%$ of the total variance.

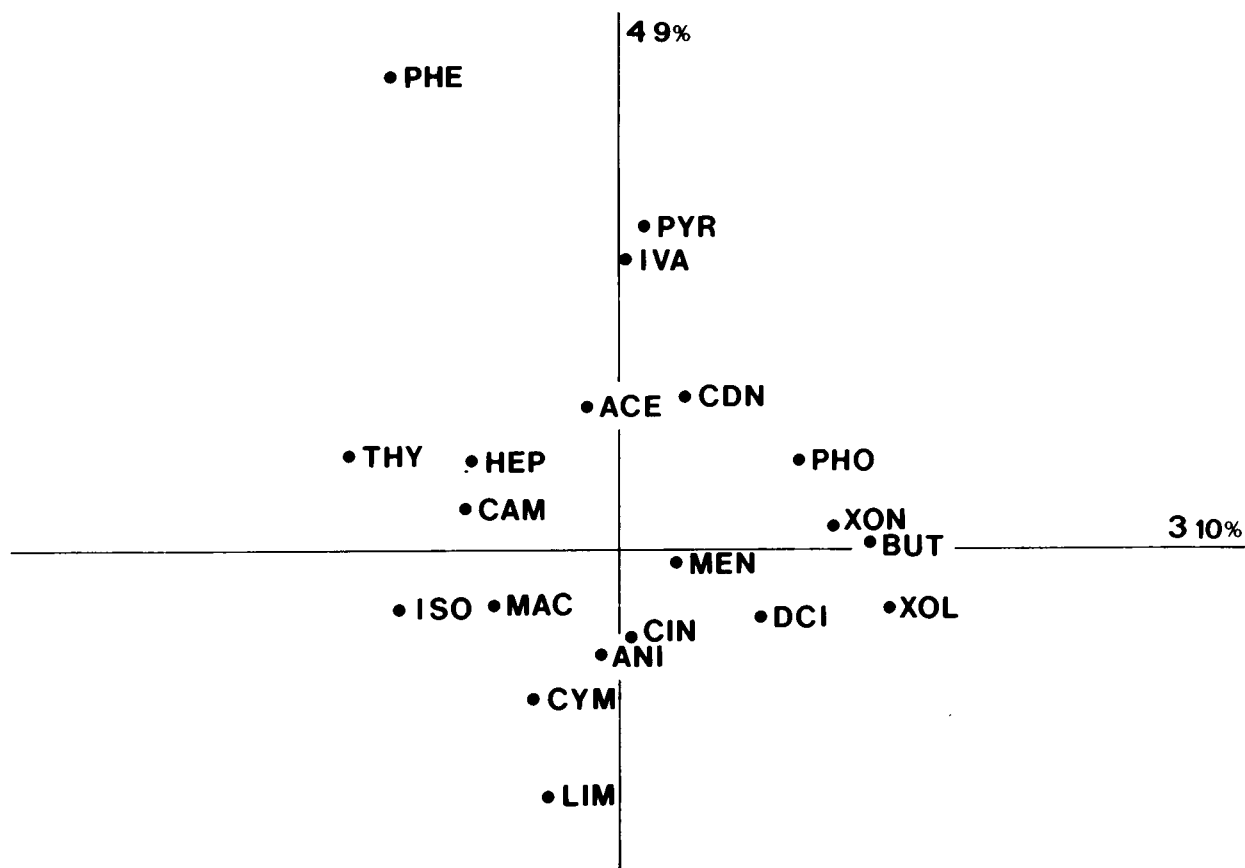


Fig. 8. Two-dimensional mapping of odorants in the space defined by factors 3 and 4 derived from factor analysis. This plane includes $10 + 9 = 19\%$ of the total variance. The odorants are coded as in Table I.

decrease of the residual variance with each additional factor considered. This obvious multidimensionality suggested that numerous and widely independent chemosensory properties were involved in the stimulating action of the tested stimuli.

The first factor (associated variance 21%) was found to be highly correlated with cineole and camphor. This pair was opposed to heptanol and methyl amylketone and well discriminated from the other compounds. The second factor (associated variance 12%) was correlated with anisole, acetophenone and thiophenol, 3 aromatic-ringed molecules. The third factor (associated variance 10%) tended to isolate cyclohexanol, cyclohexanone and D-citronellol. Finally, the fourth factor was specially correlated with *p*-cymene and D-limonene. It will be noted that cyclodecanone, menthol and isovaleric acid needed 3

additional independent factors to be correctly represented, the 5th, 6th and 7th, respectively.

The arrangement of the receptor cells in the same olfactory space (Fig. 9) did not reveal any noticeable properties. The representative points of the receptor units scattered widely over the odour space. Only the most selective units which occupied peripheral locations were found to be well individualized with respect to the other units. This is exemplified by unit 58 which responded to cineole and camphor only and occupied a peripheral zone of the space, in the cineole-camphor region.

Odorant groups

In factor analysis some stimuli were consistently found to lie in mutual proximity along each of the main factorial axes. These stimuli can be considered

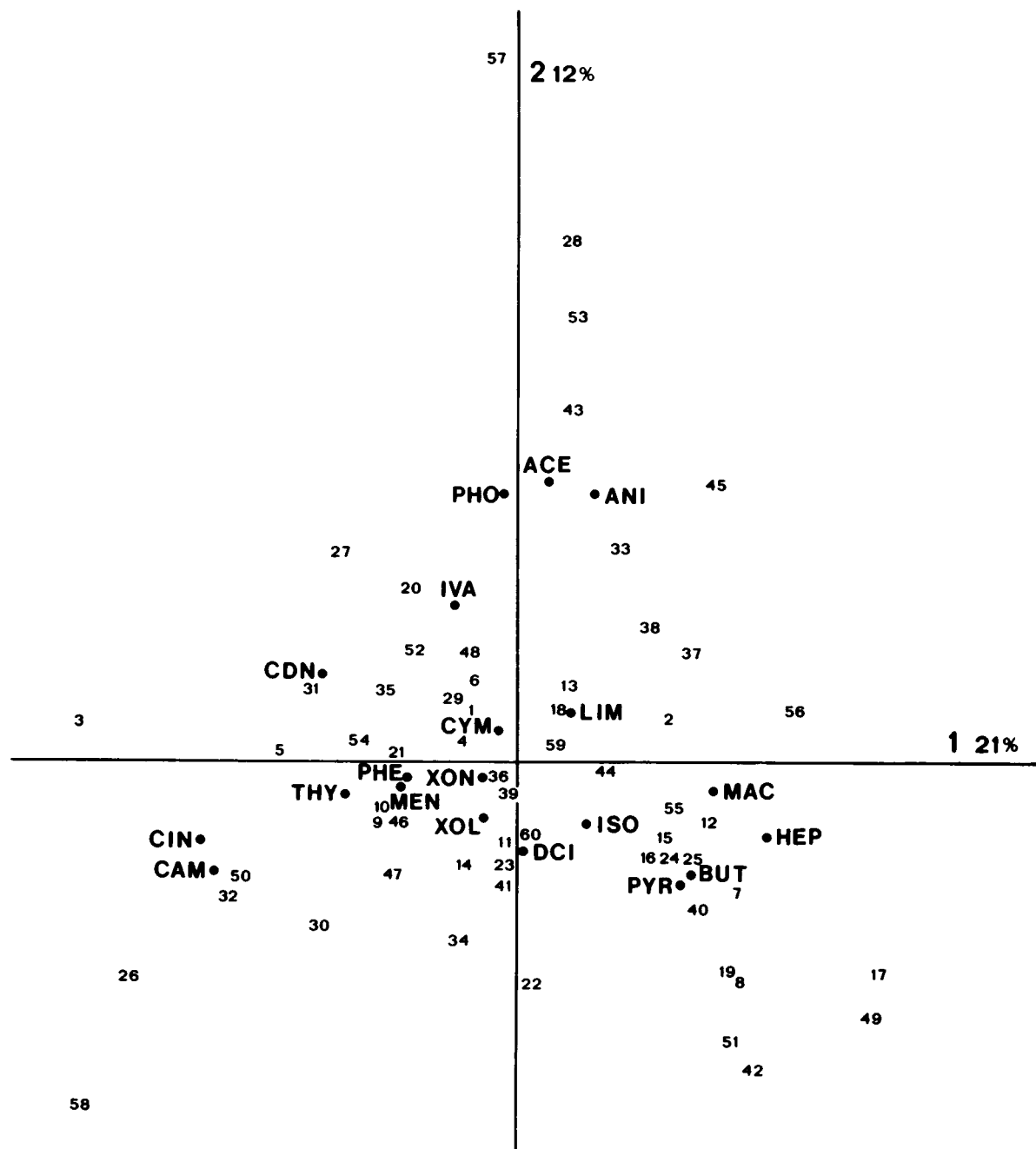


Fig. 9. Two-dimensional mapping of both odorants and receptor units in the space defined by the first 2 factors derived from factor analysis. The odorants are coded as in Table I. The receptor units are represented by their serial number as defined in Fig. 4.

as distributed in loose groupings. Five small groups could be identified:

cineole and camphor,
 anisole, acetophenone and possibly thiophenol,
p-cymene and D-limonene,
 heptanol and methyl amylketone,

cyclohexanone, cyclohexanol and citronellol.

It can be further noted that isoamyl acetate was consistently located not far from methyl amylketone and heptanol. The remaining stimuli, isovaleric acid, cyclodecanone, pyridine, butanol, menthol, thymol and phenol displayed no clear tendency to clustering.

In order to further investigate the organization of the olfactory stimuli the mathematical technique of non-hierarchical descending clustering⁸ was employed. The computation is referred to as descending because the program begins analysis with a single ensemble of all the n objects and then partitions this ensemble into 2, 3 . . . n classes. Successive steps of partitioning proceed until n classes of one object are involved. For each level, the partition is optimal when the within-class dispersion is made minimal. Practically the n -class level progresses to the $n + 1$ level by splitting the more dispersed class; however, minimizing dispersal can lead to transfer of an object from one class to another (non-hierarchical algorithm).

The first 8 levels of non-hierarchical clustering applied to receptor cell responses to odorants are shown in Table II. It can be seen that each odorant pair or group previously described in factor analysis diagrams corresponds with a distinct class of the 8th partitioning level. They are: (1) the cineole–camphor pair; (2) the anisole–acetophenone pair; (3) the cyclohexanone–cyclohexanol–D-citronellol group; (4) the heptanol–methyl amylketone and isoamyl acetate group; (5) the *p*-cymene–D-limonene pair. Additional observations can be made considering the

fate of some classes in the progress of the partitioning process. For example, one can see that the *p*-cymene–D-limonene pair was isolated in a class as early as the 5th level and that the class did not change its content through 4 successive steps. This suggests that the compounds are very close to each other whereas they are rather distant from any other element outside the pair. This can also be seen in the acetophenone–anisole pair which was separated at level 6. It will further be noted that some compounds remained associated through several partitioning steps before final separation. For example, cyclodecanone was associated with cineole and camphor through 4 successive steps.

DISCUSSION

The different mathematical procedures employed for processing the original data leads to convergent results in terms of the relationships which emerge among odour stimuli. Similarities between odorants appeared to vary widely, from independence to strong correlation, the latter case being exemplified by those compounds included in the same group. It will be further noted that even pairs of very dissimilar

TABLE II

Distribution of the odorants into classes derived from non-hierarchical descending taxonomy

Eight successive steps of the analysis are represented.

Level 1	Level 2	Level 3	Level 4	Level 5	Level 6	Level 7	Level 8
Isovaleric acid (IVA)	IVA	IVA	IVA	IVA	IVA	IVA	IVA
Phenol (PHE)	PHE	PHE	PHE	PHE	PHE	PHE	PHE
Thiophenol (PHO)	PHO	PHO	PHO	PHO	PHO	PHO	PHO
Thymol (THY)	THY	THY	THY	THY	<u>THY</u>	<u>THY</u>	<u>THY</u>
Acetophenone (ACE)	ACE	ACE	ACE	ACE	<u>ACE</u>	<u>ACE</u>	<u>ACE</u>
Anisole (ANI)	ANI	CIN	ANI	ANI	ANI	ANI	ANI
1,8-Cineole (CIN)	CIN	CAM	<u>CIN</u>	<u>CIN</u>	<u>CIN</u>	<u>CIN</u>	<u>CIN</u>
DL-Camphor (CAM)	CAM	CDN	CAM	CAM	CAM	CAM	<u>CAM</u>
Cyclodecanone (CDN)	CDN	MEN	CDN	CDN	CDN	<u>CDN</u>	CDN
L-Menthol (MEN)	MEN	<u>XON</u>	<u>MEN</u>	<u>MEN</u>	<u>MEN</u>	<u>MEN</u>	<u>MEN</u>
Cyclohexanone (XON)	<u>XON</u>	DCI	<u>XON</u>	<u>XON</u>	<u>XON</u>	XON	XON
D-Citronellol (DCI)	DCI	XOL	DCI	DCI	DCI	DCI	DCI
Cyclohexanol (XOL)	XOL	BUT	XOL	XOL	XOL	<u>XOL</u>	<u>XOL</u>
Butanol (BUT)	BUT	PYR	BUT	<u>BUT</u>	<u>BUT</u>	<u>BUT</u>	<u>BUT</u>
Pyridine (PYR)	PYR	MAC	<u>PYR</u>	<u>PYR</u>	<u>PYR</u>	<u>PYR</u>	<u>PYR</u>
Methyl-amylketone (MAC)	MAC	ISO	MAC	MAC	MAC	MAC	MAC
Isoamyl acetate (ISO)	ISO	HEP	ISO	ISO	ISO	ISO	ISO
n-Heptanol (HEP)	HEP	ANI	HEP	<u>HEP</u>	<u>HEP</u>	<u>HEP</u>	<u>HEP</u>
p-Cymene (CYM)	CYM	CYM	CYM	<u>CYM</u>	<u>CYM</u>	<u>CYM</u>	<u>CYM</u>
D-Limonene (LIM)	LIM	LIM	LIM	LIM	LIM	LIM	LIM

stimuli were not negatively correlated at the significance threshold. This provides good evidence that the membrane mechanisms involved in the apparently distinct reception processes do not have completely separate and reciprocally exclusive distributions in receptor cells. This conclusion is in agreement with that of earlier studies^{7,19–22}.

An important question regarding the interpretation of the findings is that of the incidence of stimulus intensity on the discrimination pattern observed. Since it has been demonstrated that receptor cell selectivity depended on odour concentration to some extent, the consequences of using each stimulus at a single and high concentration must be discussed. Considering a particular receptor cell, a part of its ability to discriminate between diverse stimuli, in terms of threshold or response magnitude, may be based on the differential access of the molecules of this receptor. Odorant discrimination may reflect, for example, different molecular properties of solubility and diffusion in the mucus. In addition, discrimination involves differentiated interactions between odour molecules and the receptor membrane. That several types of molecule recognition mechanisms are involved in the receptor cell responses is proved by the fact that several cells of the same preparation, even taken at the same location, display quite different response profiles and, when they happen to respond to the same stimuli, order these stimuli differently in terms of threshold or response magnitude. In this study, methodological constraints required the use of a single concentration for each stimulus. This single concentration was chosen in the upper range in order to maximize and hopefully standardize the interaction between odorants and the receptor membrane. It can be argued that highly concentrated stimuli may have resulted in non specific interactions, for example membrane desorganization, and can have introduced a noise level which masks more significant information. It can be noted that several cases of stimulus similarity and dissimilarity observed in this study are excellent replications of observations made in earlier experiments with the same stimuli but at different concentration^{7,19,20}. In another study^{21,22}, the effect of stimulus concentration on odorant discrimination by receptor cells was investigated using odorants at two different concentrations. It was found that the lower concentrations were better dis-

criminated than the higher ones. However, for some of these odorants, the higher concentration level was more closely associated with the lower one than with any other odorant of the tested sample. This observation seems to indicate that discrimination at high stimulation levels is based on the same type of processes as those involved at lower levels. Nevertheless, common assumptions on the low specificity of the odorant–receptor site interactions lead to the view that the particular combination of receptor sites activated by an odorant undergoes significant variations when concentration is increased or decreased. Increasing concentration is likely to result in the recruitment of low-affinity receptors which do not significantly contribute to odorant reception at lower concentrations. It is therefore probable that concentration influences the pattern of similarities between odorants to some extent. For this reason the similarity pattern described in this study must be considered conservatively as a particular image of the olfactory space in the upper range of odorant concentrations.

In the present study, as in several previous ones^{7,20,22}, camphoraceous odorants were found to be especially well discriminated from other compounds. In factor analysis, they were well represented by one of the first factors of the multidimensional space. This indicates that these odorants possess very specific stimulating properties.

A major outcome of several previous experiments was the large distance separating camphoraceous compounds from odorants of the so-called 'aromatic group' along the first axis of factor analysis^{7,20}. In the analysis presented here, it can be observed that the 'aromatic odorants' (acetophenone, anisole and thiophenol) are well isolated from the other odorants and especially from camphor and cineole along the second axis. The present results are therefore in good agreement with earlier observations.

Another conspicuous feature of the distribution of the stimuli in the first factorial plan is the large distance separating spherical molecules like camphor and cineole and straight-chained molecules like heptanol and methyl amylketone. The involvement of a shape factor in the discrimination processes has already been suspected⁴. The correlation coefficient computed for the cyclohexanol–*n*-butanol pair points out a close relationship between these odorants. This is observable along three dimensions of the factorial

space but not along the first factor which introduces an obvious discrimination of these alcohols. One may suggest that this separation is based upon steric differences between the alcohols which would further support the assumption that a certain amount of molecule discrimination is associated with shape properties principally represented by the first factor in this experiment. However, in agreement with a previous study undertaken along this line⁴, the findings indicate that shape can not be considered as the unique determinant of the characteristics of the olfactory space representation. The close proximity of D-citronellol and cyclohexanone and the marked separation of phenol and thiophenol illustrate this point.

The close proximity of cyclohexanol and cyclohexanone in the factorial space is also in agreement with earlier observations²⁰. The present results further indicate that D-citronellol is related to this pair and that the three compounds require a particular factor (factor 3) to be correctly represented.

p-Cymene and D-limonene which were introduced as representatives of a 'terpene group'²² were found to be highly correlated and specially represented by the fourth axis. In the cloud of odour representative points, this pair occupies a more central position than any other group, which suggests that the molecular properties involved in their recognition by receptor cells are not as clearly distinctive as those represented in the other groups.

In several previous experiments, menthol and cyclodecanone had shown a persistent tendency to be located in the area of the olfactory space surrounding the camphor group²². This tendency was also observed in the present study and it can be assumed that these compounds share some properties of camphor and related substances. Nevertheless, they cannot be exclusively defined by this relationship. It is notable, for example, that menthol lies in an intermediate position between the camphor group, the cyclohexanol group and the terpene group, as a result of positive correlations with cineole, cyclohexanol and D-limonene. This suggests that, considering the discriminating processes, a molecule can be depicted as being the intersection of several independent subsets of properties.

The present investigation, when compared with the results of earlier studies, shows that the odorant multidimensional space based on electrophysiologic-

al receptor cell responses recorded from a given animal species, is stable. The organization of the odorants in this space is not inconsistent with physicochemical principles or with psychophysical estimates of qualitative similarities. It is compatible with the well-known property of the olfactory system: discrimination of each type of molecule from an other. Therefore, despite their complex response profiles, the receptor cells build an odorant space which is very different from the 'chaos' perceived by the first investigators^{9,11}.

The findings can be interpreted according to the basic assumption that the odour stimuli are detected by several types of broadly selective receptor sites distributed at random among receptor cells.

Our approach is obviously not appropriate to identify and characterize the receptor sites. Nevertheless, these findings are not without relevance to the properties of the receptors. In this connection, it can be argued that an odorant grouping results from two sets of conditions: (1) odorants presenting a certain number of common physicochemical properties; and (2) receptor structures able to detect these relevant properties. An odorant group therefore refers to an ensemble of receptive properties responsible for the grouping. The question arises whether this ensemble of receptive properties is present in a single type of receptor site or in several of them. A definitive answer is not possible. There is no doubt that odorants in the same group act upon several distinct receptor sites since they are partly discriminated from each other; however, their grouping as such might be due to a more restricted number of non-discriminating receptors.

Another question is whether the receptor site(s) involved in the separation of a defined odorant group can also be involved in other groups. Is there any overlapping, for example, between the receptors sensitive to camphoraceous molecules, on the one hand, and those detecting molecules of the heptanol group on the other? A statistical computation based on the assumption of randomly distributed receptor sites, indicates that the overlapping ratio of camphor acceptors and heptanol acceptors is necessarily low, if not null. As a matter of fact, the number of receptor cells responding to both cineole and heptanol is not greater — and even is less — than the number expected according to the random-distribution assumption.

tion. If both types of odorants shared some receptor sites, these common receptors should presumably not account for more than 2–3% of the total responses.

It thus appears that any investigation that plans to use a selection of stimulus molecules acting on markedly different receptor sites could select these molecules from different odorant groups, and especially from groups which occupy opposite locations in the stimulus space described herein. A recent study using a chemical modification approach of receptor cell sensitivity illustrates this possibility⁵. More generally, the present findings are proposed as a reference for other future studies dealing with odour dis-

crimination in different animal species and/or at other levels of the olfactory system.

ACKNOWLEDGEMENTS

This study was supported by the Centre National de la Recherche Scientifique (GRECO 'Olfaction' and GIS 'Physiologie sensorielle'). During a part of this work, G. Sicard received personal support from the Fondation Roudnitska. The authors wish to express many thanks to P. MacLeod, M. Chastrette, B. Eminent, M. F. Revial and A. Duchamp for their valuable advice during the preparation of this study. The technical assistance of M. Vigouroux is gratefully acknowledged.

REFERENCES

- 1 Amore, J. E., Specific anosmia and the concept of primary odors, *Chem. Senses and Flavour*, 2 (1977) 267–281.
- 2 Baylin, F., Temporal patterns and selectivity in the unitary responses of olfactory receptors in the Tiger salamander to odor stimulation, *J. gen. Physiol.*, 74 (1975) 17–36.
- 3 Benzecri, J. P., *L'Analyse des Données, Vols. 1 and 2*, Dunod, Paris, 1963.
- 4 Chastrette, M., An approach to a classification of odours using physicochemical parameters, *Chem. Senses*, 6 (1981) 157–163.
- 5 Delaleu, J. C. and Holley, A., Investigations of the discriminative properties of the frog's olfactory mucosa using a photoactivable odorant, *Neurosci. Lett.*, 37 (1983) 251–256.
- 6 Dodd, G. H., Ligand binding phenomena in chemoreception. In G. Benz (Ed.), *Structure Activity Relationship in Chemoreception*, Information Retrieval, London, 1976, pp. 55–63.
- 7 Duchamp, A., Revial, M. F., Holley, A. and MacLeod, P., Odor discrimination by frog olfactory receptors, *Chem. Senses and Flavour*, 1 (1974) 213–233.
- 8 Fages, R., *Seminaire I.R.I.A.*, Lyon, 1974.
- 9 Gesteland, R. C., Lettvin, J. Y., Pitts, W. H. and Rojas, A., Odor specificities of the frog's olfactory receptors. In Y. Zotterman (Ed.), *Olfaction and Taste, Vol. 1*, Pergamon Press, London, 1963, pp. 7–21.
- 10 Gesteland, R. C., Receptor membrane functions in olfaction. Implications from single unit study. In G. Benz (Ed.), *Structure Activity Relationships in Chemoreception*, Information Retrieval, London, 1976, pp. 161–168.
- 11 Gesteland, R. C., The new physiology of odor, *Environ. Prog.*, 1 (1982) 94–97.
- 12 Getchell, M. L. and Gesteland, R. C., The chemistry of olfactory reception: stimulus specific protection from sulfhydryl reagent inhibition, *Proc. nat. Acad. Sci. U.S.A.*, 69 (1972) 1494–1498.
- 13 Getchell, T. V., Unitary responses in frog olfactory epithelium to sterically related molecules at low concentration, *J. gen. Physiol.*, 64 (1974) 241–261.
- 14 Getchell, T. V., The location of olfactory receptor sites. Inference from latency measurements, *Biophys. J.*, 29 (1980) 397–412.
- 15 Goldberg, S. J., Turpin, J. A. and Price, S., Anisole binding protein from olfactory epithelium: evidence for a role in transduction, *Chem. Senses and Flavour*, 4 (1979) 207–214.
- 16 Holley, A. and Døving, K. B., Receptor sensitivity, acceptor distribution, convergence and neural coding in the olfactory system. In J. Le Magnen and P. MacLeod (Eds.), *Olfaction and Taste, Vol. 6*, Information Retrieval, London, 1977, pp. 113–123.
- 17 Holley, A. and MacLeod, P., Transduction et codage des informations olfactives chez les vertébrés, *J. Physiol. (Paris)*, 73 (1977) 725–828.
- 18 Juge, A., Holley, A. and Rajon, D., Olfactory receptor cell activity under electrical polarization of the nasal mucosa in the frog. II — Responses to odour stimulation, *J. Physiol. (Paris)*, 75 (1979) 929–938.
- 19 Revial, M. F., Duchamp, A. and Holley, A., Odour discrimination by frog olfactory receptors: a second study, *Chem. Senses and Flavour*, 3 (1978) 7–21.
- 20 Revial, M. F., Duchamp, A., Holley, A. and MacLeod, P., Frog olfaction: odour groups, acceptor distribution and receptor categories, *Chem. Senses and Flavour*, 3 (1978) 23–33.
- 21 Revial, M. F., Sicard, G., Duchamp, A. and Holley, A., New studies on odour discrimination in the frog's olfactory receptor cells. I — Experimental results, *Chem. Senses*, 7 (1982) 175–190.
- 22 Revial, M. F., Sicard, G., Duchamp, A. and Holley, A., New studies on odour discrimination in the frog's olfactory receptor cells. II — Mathematical analysis of electrophysiological responses, *Chem. Senses*, in press.

Influence of stimulus intensity on odour discrimination by olfactory bulb neurons as compared with receptor cells

André Duchamp and Gilles Sicard

*Laboratoire d'Electrophysiologie and Laboratoire Associé au CNRS de
Physiologie Neurosensorielle, Université Claude Bernard, F-69622 Villeurbanne
Cedex, France*

(Received July 1983; accepted after revision December 1983)

Abstract. Previously reported electrophysiological responses recorded from individual neurons in the olfactory bulb of frogs stimulated with odorous compounds were further analyzed using statistical methods. Five of the odorants were delivered at two concentrations. The pattern of discrimination among these odorants was investigated with the aid of the Pearson's correlation test and Benzecri's 'analyse des correspondances'. Special attention was paid to the incidence of odour concentration on this discrimination pattern. The results were compared with those of a similar study performed on receptor cells in the same experimental conditions. The comparison indicated that the information processing in the olfactory bulb seems to improve discrimination between chemically different stimuli, especially those poorly discriminated by receptor cell responses, whereas it protects this discrimination against a massive influence of the intensity of the stimuli.

Introduction

When stimulated with an odorous compound the olfactory receptor cells deliver a complex neural message, whose spatial and temporal characteristics encode the quality and the intensity of the stimulus. This message converges onto a much smaller number of second-order neurons in the olfactory bulb. The neural activity induced in these neurons activates internuncial cells which participate in a local shaping of the message via inhibitory processes. A large number of anatomical and electrophysiological studies have described the organization and the functional properties of the intrinsic bulbar circuits, and several assumptions have been made on the role played by the olfactory bulb in the processing of the qualitative and quantitative aspects of the afferent information (see Holley and MacLeod, 1977 for a review). Testing these assumptions requires comparison of the patterns of activity induced across receptor cells by defined olfactory stimuli with the resulting patterns evoked across second-order neurons.

Following the first investigations of electrical responses recorded from individual receptor cells (Gesteland *et al.*, 1963) and olfactory bulb neurons (Døving, 1964), it appeared that extensive investigations would be required before the neural mechanisms of odour quality discrimination were understood. Moreover, the variability of the cell responses to a same odour quality as a function of stimulus concentration, as investigated on a few cells, suggested that the coding of quality was narrowly associated with that of intensity. A pertinent way of exploring the relationship between the two codes would be to compare the across-cell response patterns induced by different odour stimuli at several intensity levels, i.e., to compare response-concentration functions. However, this approach has

substantial technical difficulties if a large number of different odorants have to be tested on the same set of cells.

Many authors have studied the quality coding or the intensity coding of odours either in receptor cells or in bulbar neurons (Gesteland *et al.*, 1963; Døving, 1964, 1966a,b; Higashino *et al.*, 1969; O'Connell and Mozell, 1969; Kauer, 1974; Blank and Mozell, 1976; Getchell and Shepherd, 1978a,b; Meredith and Moulton, 1978; Duchamp *et al.*, 1974; Holley *et al.*, 1974; Revial *et al.*, 1978). However, in each of these studies, when the qualitative aspects of the coding were considered, the quantitative aspects received little attention, and *vice versa*. Mathews (1972) recorded the activity of receptor cells and bulbar neurons in response to a set of stimuli. He used stimuli at two concentrations in his study of receptor cells but not in his study of bulbar neurons, so investigations on quality/intensity interactions could not be extended to the olfactory bulb level. More recently, Revial *et al.* (1982, 1983) reported the results of an extensive investigation of the discriminative properties of receptor cells in the frog. We attempted to reproduce very similar experimental conditions in an investigation of the discrimination properties of olfactory bulb neurons in the same species. Because the same stimuli were used at similar concentrations, a comparison could be made between neuron properties at both levels (Duchamp, 1982; Duchamp and Sicard, 1984). It was shown that the main features of the pattern of resemblances and differences among stimuli, as observed at the periphery, were rather closely replicated at the olfactory bulb level and that second-order neurons seemed to improve discrimination of some stimuli (isomers) which were poorly distinguished from each other by receptor cells.

In part of their investigation of receptor cells, Revial *et al.* used several stimuli at two different concentrations in an attempt to estimate the degree of interference of the intensity of the stimuli with their qualitative dimension. The present study focuses on the same problem. Statistical tests were applied to data reported by Duchamp (1982) to analyze the consequences of changing stimulus concentration on the pattern of discrimination among odorants performed by olfactory bulb neurons. The results of these analyses are compared with those of similar studies performed on receptor cells (Revial *et al.*, 1982, 1983), and the interactions between intensity coding and quality coding at the first two stages of the olfactory pathways are discussed.

Methods

The methods used to collect the original data which are mathematically analyzed in this paper have been reported elsewhere (Duchamp, 1982). These methods will be briefly summarized.

Preparation

Frogs (*Rana ridibunda*) were immobilized by s.c. injection of tubocurarine (0.1–0.2 ml, 0.3%). One of the olfactory mucosae and the ipsilateral olfactory bulb were exposed under local anaesthesia with procaine hypochloride (5%). The animals were kept at constant temperature (13°C) throughout the experiments. Cutaneous respiration was preserved by wrapping the animals in wet gauze, and

an additional supply of oxygen was provided by a tracheal air flow.

Recording

Single-unit activity of bulbar neurons was recorded with metal-filled glass micro-electrodes plated with platinum black (Gesteland *et al.*, 1959). The neuroepithelial extracellular slow potential (EOG) was simultaneously recorded. It was used to check the physiological condition of the neuroepithelium and its time course served as a chronological reference for identifying the type (inhibitory or excitatory) of some ambiguous neural responses (Døving, 1964; Kauer, 1974). Both types of electrical activity were visualized using an oscilloscope and recorded on paper.

Response quantification

The procedure used to quantify the spontaneous activity and the responses of excitatory and inhibitory types have been described in Duchamp (1982). Briefly, excitatory responses were evaluated in terms of maximum discharge frequency (spikes/min) from the duration of the 3–4 successive shortest interspike intervals found in the initial phase of the odour-evoked discharge. Inhibitory responses were represented by one of the following values: 10, 5, 2, or 1 spike/min, depending on the duration of discharge interruption and whether or not an activity rebound occurred afterwards.

Odorant selection

Nineteen odorants were systematically presented to the olfactory mucosa. Five of them were presented at two concentration levels, the lowest level differing by 30–40% from the highest one (Table I). The concentration values were identical to those used by Revial *et al.* (1982, 1983) in their investigation of receptor cells with the same odorants. Odorant selection had been partly based on results of prior discrimination studies. Two of them were known to pertain to a defined 'odorant group': benzaldehyde was selected as a representative of the 'aromatic group' (Duchamp *et al.*, 1974) and cineole as a representative of the 'camphor group' (Revial *et al.*, 1978). Pyridine had been used in a previous study (Duchamp *et al.*, 1974) and the qualitative relationship between this odorant and the aromatic group documented. On the basis of the high response rates elicited by these compounds and reported in former studies, the authors predicted that these compounds would retain significant stimulating effectiveness when used at lower concentration. Limonene had been arbitrarily selected from several terpenes included in the stimulus set. Finally, cyclohexane-carboxaldehyde had been retained in connection with its aldehyde group borne by the cyclohexane ring, with reference to benzaldehyde in which the aldehyde group is borne by the aromatic ring.

Olfactory stimulation

Stimuli were automatically delivered by a gas-phase dilution olfactometer (Duchamp *et al.*, 1974). The different stimuli were presented in randomly determined succession. Odorant concentration was calculated from the saturated

Table I. Odorants used with an estimation of their concentration in the stimulating odour flow at 20°C. For several compounds the saturated vapor pressure could not be known and the concentrations were not determined.

	Code		Chemical name	Concentration (x 10 ¹⁴ molecules/ml)	
	C ₁	C ₂		C ₁	C ₂
1	BZA	bza	Benzaldehyde	90	35
2	CIN	cin	Cineole	75	45
3	CYM		p-Cymene	100	
4	DMS		α ,4-Dimethylstyrene	65	
5	HEX		2-Hexen-1-al.	-	
6	IQI		Isoquinoline	10	
7	LIM	lim	d-Limonene	150	100
8	MTA		p-Menthane	200	
9	MTN		Δ 3,p-Menthene	-	
10	MEN		Menthol	7	
11	PHE		Phenol	200	
12	PYR	pyr	Pyridine	650	450
13	PYL		1-Methyl-pyrrole	-	
14	QUI		Quinoline	10	
15	TER		α -Terpinene	-	
16	THY		Thymol	6	
17	XAN		Cyclohexane	6300	
18	XCA	xca	Cyclohexane-carboxaldehyde	-	$\frac{1}{2} \times C_1$
19	XOL		Cyclohexanol	100	

vapour pressure, and the rate of dilution of this vapour by the odourless vector gas flow. Stimulations were delivered for 2 s every 2 min. Rinses with the odourless gas flow were interspaced between stimulations to prevent possible interaction between successive stimulations.

Results

Statistical treatments based on calculation of Pearson's '*r*' correlation coefficient and on 'analyse factorielle des correspondances' (Benzecri, 1973) were used to describe the pattern of discrimination among 19 odorants delivered to the olfactory mucosa during single-unit recording of 43 neurons from the olfactory bulb. Five of the 19 odorants having been delivered at two concentration levels, the analysis dealt with a matrix of $(19 + 5) \times 43 = 1032$ responses.

'*r*' correlation coefficients

For each pair of stimuli, the test allows us to compare the collections of responses induced from the set of neurons investigated. Significant values for '*r*' indicate that the odour stimuli under comparison show some degree of similarity in their stimulating action.

Figure 1 represents all correlations among stimuli which reached the significance threshold at $p = 0.001$. If we do not take into account the five low levels of concentration, it is possible to distinguish three groups of stimuli among the pattern of inter-relationships: (i) DMS, CYM, TER, LIM and MTN, to which THY

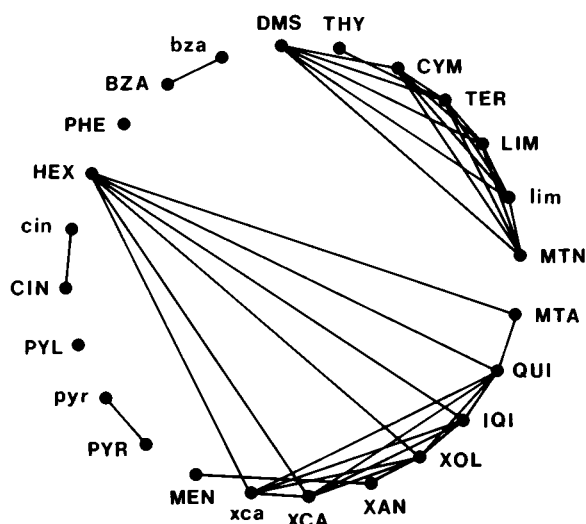


Fig. 1. Correlations between odorants according to the calculation of the Pearson's ' r ' correlation coefficient. All these correlations are significant at the 0.1% threshold. Odorant names abbreviated according to code in Table I.

Table II. ' r ' values computed for the five concentration pairs. p : significance level. ΔE : percentage of excitatory responses which were not reproduced at lower concentration.

Concentration pairs	Olfactory bulb neurons			Receptor cells		
	' r '	p	$\Delta E\%$	' r '	p	$\Delta E\%$
PYR - pyr	0.91	0.001	27	0.78	0.001	11
XCA - xca	0.84	0.001	41	0.62	0.001	33
LIM - lim	0.81	0.001	33	0.75	0.001	18
BZA - bza	0.75	0.001	33	0.49	0.01	36
CIN - cin	0.71	0.001	26	0.47	0.01	38

is linked; (ii) MTA, QUI, IQI, XOL, XAN, XCA and HEX, to which MEN is linked; and (iii) PYR, PYL, CIN, PHE and BZA, a group of odorants which are isolated from each other and from all other odorants.

When the odorants are tested at two concentrations, the higher concentration is always found to be highly correlated with the lower one. The ' r ' values of the correlation coefficient for the five paired concentrations are the highest among all the 275 possible pairs. These values are presented in Table II. In addition, as can be seen in Figure 1, when the higher level in a concentration pair is found to be uncorrelated with the rest of the stimulus set, the lower level is also found to be uncorrelated (CIN, BZA, PYR). When the higher concentration is included in an ensemble of cross-correlated stimuli, the lower concentration remains included in this ensemble (LIM, XCA).

Let us consider the ' r ' values calculated for the 45 pairs formed by all combi-

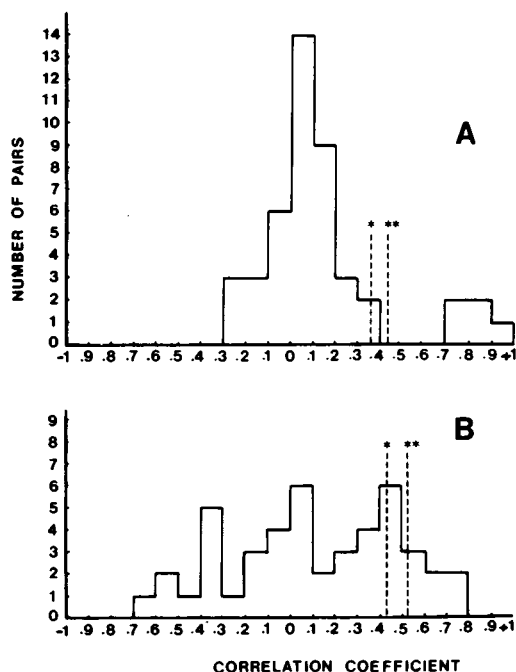


Fig. 2. Distribution of the Pearson's 'r' correlation coefficient values for the 45 pairs formed by all combinations of the five stimuli tested at two concentrations in the olfactory bulb (Histogram A) and in the neuroepithelium (Histogram B). *: significance level 1%; **: significance level 0.1%.

nations of five compounds tested at two concentrations. The distribution of these 'r' values is shown in histogram A in Figure 2. This distribution is bimodal. Forty uncorrelated pairs are grouped around the 0–0.1 class, whereas a second peak separated from the first one by three empty classes, groups five pairs of highly correlated stimuli. These five pairs can be identified as formed by the two levels of concentrations of the five compounds.

Analyse factorielle des correspondances

The original response data were analyzed through a comparison of the association profiles of the odorants and of the neurons based on χ^2 computation. A multi-dimensional olfactory space is defined by a limited number of factors. Odorants are represented in this space in such a way that euclidian distances between their representative points can be interpreted in terms of degree of qualitative similarity. The space defined by the first three factors (associated variance: 40% of the total variance) is shown in Figure 3. CYM, TER and DMS form a group; THY and the pair LIM/MIN are located not far from this group. A second group of compounds includes HEX, XCA, XOL and QUI. IQI lies at a distance from its isomer QUI. PYR and BZA are close to each other and far from the other compounds. Some other odorants occupy distinct peripheral locations; they are: PHE, XAN, CIN and PYL and to a lesser extent, IQI, MEN and MTA.

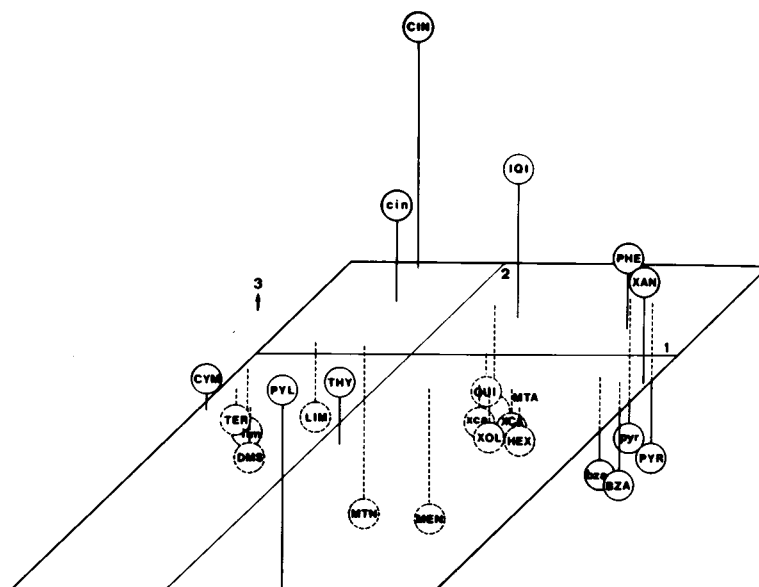


Fig. 3. Three-dimensional odorant space from factor analysis of olfactory bulb neuron responses. Odorant names abbreviated as in Table I.

When the respective locations of the points representing the two concentrations of a same odorant are considered, the close proximity of PYR and pyr, BZA and bza, XCA and xca must be emphasized. A larger distance separates lim from LIM and cin from CIN. As a rule, except for the LIM-lim pair, the position of the point representing the lower concentration of an odorant is more centrally situated than the point representing the higher concentration. However, this low-concentration point remains along the vector defined by the high-concentration point and the center of the cloud of points.

The location of the low-concentration points in the multi-dimensional space is not considerably different from that of the high-concentration points. xca is included in the same group as XCA; bza and pyr occupy locations which allow them to be considered as clearly discriminated from the rest of the odorant set. lim is situated near CYM, TER and DMS, while LIM is slightly more distant from these compounds. Finally, although cin is found more centrally located than CIN, its independence from the other compounds remains high.

Discussion

Pearson's '*r*' correlation test and factor analysis reveal a pattern of discrimination among the odorants studied. This pattern includes several groups of odorants which elicit more or less closely similar activity profiles across the neuron set on the one hand, and well-discriminated odorants which elicit more specific profiles on the other hand. The results relating to the compounds tested at two concentration levels suggest that the changes in stimulation intensity did not dramatically affect the discrimination pattern across odorants. High values

of the '*r*' correlation coefficient demonstrate a strong relationship between the response profiles obtained at high concentration and those obtained for qualitatively similar stimuli at lower concentration. This is corroborated in the factor analysis diagram by the close proximity of the representative points. It is worth noting that decreasing concentration by 30–40% for the five stimuli of the concentration test was not ineffective, as 31.8% of the excitatory responses and 62.8% of the inhibitory responses elicited by the higher concentration of these odorants disappeared when the lower concentration was delivered (Duchamp, 1982). In addition, at low concentration, the spike frequency in the remaining excitatory responses was found to be reduced with respect to that observed at higher concentration. Nevertheless, such an impoverishment of the across-neuron response profiles at low concentration did not dramatically alter their resemblance with the patterns evoked by more intense stimuli. This is presumably related to the fact that the lowest concentration of a stimulus never elicited responses from neurons that were unresponsive to the highest concentration.

It can be provisionally concluded that, within the range of concentration explored in this study, the discrimination of odour quality by bulbar neurons is relatively independent from variations affecting stimulus intensity.

Comparison with discrimination by receptor cells

Reviel *et al.* (1982, 1983) reported the results of an investigation carried out on receptor cells stimulated with a similar set of odorants, and including a concentration test performed on 30 of these receptor cells in experimental conditions exactly similar to those used in the present study. These results will be briefly recalled before being compared with those obtained from olfactory bulb neurons.

A three-dimensional representation of the olfactory space derived from factor analysis of receptor cell responses is shown in Figure 4. A 'terpene group' including TER, DMS, CYM, LIM, MTN and MTA, is visible. In this space, QUI lies close to its position isomer IQI. Several compounds are well discriminated from each other and from the other odorants: PYR, XAN, XOL and CIN.

The lower concentration of limonene (lim) is included in the 'terpene group'. The lower concentration of pyridine (pyr) lies close to the higher concentration of this compound (PYR). A larger distance separates the lower concentration of benzaldehyde from the higher one, the former being situated near the representative points of both concentrations of pyridine. Similarly, the change in concentration of cyclohexane-carboxaldehyde results in a displacement of xca with respect to XCA, with xca becoming closer to PYR, pyr and bza. With regard to cineole, although a large distance separates the two concentrations of this odorant, both appear to be equally independent from the other odorants.

For each of the five compounds tested, the distance between paired concentrations increases according to the following order: limonene, pyridine, cyclohexane-carboxaldehyde, benzaldehyde and cineole. In Table II are reported the values of the '*r*' correlation coefficient computed for the five concentration pairs. It can be seen that the order of decreasing '*r*' values is the same as the order of the increasing percentages of those excitatory responses which were not reproduced

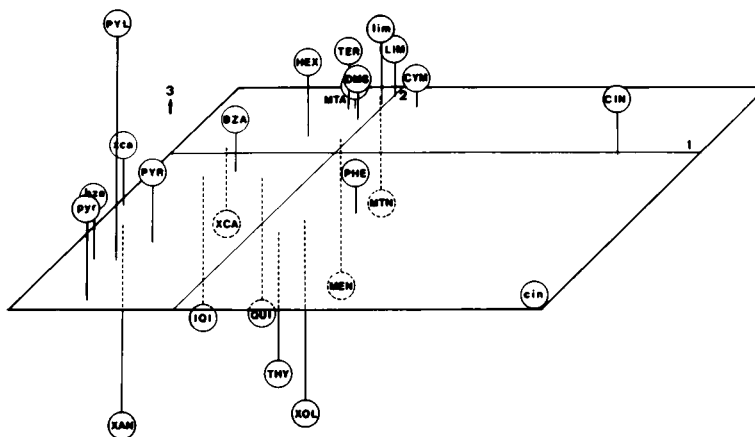


Fig. 4. Three-dimensional odorant space from factor analysis of receptor cell responses. Odorant names abbreviated as in Table I.

at lower concentration. Except for the inversion of limonene with pyridine, this order is also similar to that of the increasing distances between two concentrations of a same odorant within the olfactory space.

The distribution of the 'r' values computed for the 45 pairs formed by all combinations of five odorants tested at two concentrations is presented in histogram B, Figure 2. Among the significant positive 'r' values, the following pairs are found, in addition to the five concentration pairs: bza - PYR; bza - pyr; xca -PYR ($p < 0.001$); BZA - PYR; BZA - XCA; bza - xca ($p < 0.01$).

Significant negative correlations are also present in the histogram; they are: bza - CIN; xca - CIN; PYR - CIN ($p < 0.001$); pyr - CIN ($p < 0.01$).

The comparison of the factorial spaces derived from olfactory bulb and receptor cell data shows that second-order neurons do not dramatically modify the neural message that they receive from the periphery. In particular, those odorants which are clearly discriminated by receptor cells remain clearly distinguished from one another by olfactory bulb neurons.

The organization of the terpene group is not exactly the same at both levels of analyses. The olfactory bulb neurons operate a dissociation of this cluster into two subsets: CYM, TER, DMS and THY on the one hand, and the pair LIM-MTN on the other hand. At the olfactory bulb level, MTA is separated from the terpene group whereas it is included in this group at the receptor cell level. Another difference between the two factorial spaces concerns the relative position of the isomers QUI and IQI. This increased discrimination observed at the olfactory bulb level for those odorants poorly discriminated by receptor cells confirms the findings of a former comparative study made with a different set of stimuli (Duchamp and Sicard, 1984).

The effects of reducing stimulus concentration on the qualitative discrimination among the five compounds investigated can be analyzed by comparing histograms A and B in Figure 2. The distribution of the ' r ' values is wider for the

receptor cell responses than for the bulbar neuron responses and presents no empty classes. This distribution includes significant negative ' r ' values not found in the distribution of the olfactory bulb data. All these negative values concern pairs involving CIN, and underline the difference in the response profiles induced by this odorant on the one hand, and by bza, pyr, PYR and xca on the other hand. Among positive correlations are found not only values referring to the five concentration pairs but also values referring to pairs of qualitatively different stimuli. These stimuli are therefore poorly discriminated from one another by receptor cells.

At the olfactory bulb level the picture is clearly different. Histogram A shows a complete absence of significant correlations between qualitatively different compounds, whereas all five concentration pairs are characterized by highly significant and positive values of ' r '.

The nature and direction of the changes observed in comparing histograms A and B suggest that the information processing taking place in the olfactory bulb results in removing a part of the confusion regarding the odour quality, which is present in the neural message delivered by the receptor cells. The findings also suggest that this processing results in reducing the incidence of intensity on the characteristics of the neural message which specifies the nature of the odour stimulus.

Several aspects of the factor analysis data can be interpreted along the same line. In the multi-dimensional space derived from olfactory bulb responses, the two concentrations of each of the five investigated compounds are less distant from each other than they are in the space derived from receptor cell responses. In addition, the lower concentrations are generally less separated from the other compounds in the analysis derived from bulbar data than they are in the analysis derived from receptor cell data.

To a certain extent these results are dependent on the methods utilized for quantifying peripheral and bulbar responses. We have discussed the quantification procedures elsewhere (Duchamp, 1982; Revial *et al.*, 1982). The coherence of the results seems to indicate that our criteria are acceptable. The most arbitrary criteria are those adopted for evaluating the responses of inhibitory type occurring in the olfactory bulb. However, we verified that these responses play a minor role in the characteristics of the discrimination patterns computed. For example, when all the inhibitory responses are counted as null responses, i.e., when their values are replaced with spontaneous activity values, the ' r ' correlation coefficient values between odorant pairs, including concentration pairs, are very little affected and their significance level is not changed. This must not be taken as demonstrating that the inhibitory processes play no role in the information processing. Presumably this role consists mainly of preventing those neurons which receive only a few synapses from active receptor cells from being excited at high stimulus concentration (Duchamp, 1982).

It seems, therefore, that quality-based differences between afferent messages are maintained or amplified and that intensity-based differences are reduced. In other words, the olfactory bulb seems to improve the qualitative discrimination between chemically different stimuli while it protects this discrimination against a

massive influence of the intensity of the stimuli.

These conclusions are in agreement with several predictions inferred from an analysis of the role of the glomerular convergence (Van Drongelen *et al.*, 1978) and, more generally, from the consideration of the anatomical and functional properties of the olfactory bulb organization (Holley and Mac Leod, 1977).

Acknowledgements

This work is part of a 'Doctorat ès Sciences' to be submitted to the Université Claude Bernard, Lyon I, France (A. Duchamp). The authors thank Pr. A. Holley for his continual guidance and help. This work was partly supported by grants from the CNRS (GIS 'Physiologie Sensorielle' and GRECO 32 Olfaction).

References

- Benzecri, J.P.: 1973, *L'analyse des données. II. L'analyse des correspondances*, Paris, Bruxelles, Montreal: Dunod.
- Blank, D.L. and Mozell, M.M.: 1976, 'Olfactory receptor response characteristics: a factor analysis', *Brain Res. Bull.*, **1**, 185-192.
- Døving, K.B.: 1964, 'Studies on the relation between the frog's electro-olfactogram (EOG) and single unit activity in the olfactory bulb', *Acta Physiol. Scand.*, **60**, 150-163.
- Døving, K.B.: 1966a, 'An electrophysiological study of odour similarities of homologous substances', *J. Physiol. (Lond.)*, **186**, 97-109.
- Døving, K.B.: 1966b, 'Analysis of odour similarities from electrophysiological data', *Acta Physiol. Scand.*, **68**, 404-418.
- Duchamp, A.: 1982, 'Electrophysiological responses of olfactory bulb neurons to odour stimuli in the frog. A comparison with receptor cells', *Chem. Senses*, **7**, 191-210.
- Duchamp, A. and Sicard, G.: 1984, 'Odour discrimination by olfactory bulb neurons: statistical analysis of electrophysiological responses and comparison with odour discrimination by receptor cells', *Chem. Senses*, in press.
- Duchamp, A., Revial, M.F., Holley, A. and Mac Leod, P.: 1974, 'Odor discrimination by frog olfactory receptors', *Chem. Senses*, **1**, 213-233.
- Gesteland, R.C., Howland, B., Lettvin, J.Y. and Pitts, W.H.: 1959, 'Comments on microelectrodes', *Proc. Inst. Radio Engineers*, **47**, 1856-1862.
- Gesteland, R.C., Lettvin, J.Y., Pitts, W.H. and Rojas, A.: 1963, 'Odor specificities of the frog's olfactory receptor', in Zotterman, Y. (ed.), *Olfaction and Taste I*, Pergamon Press, London, pp. 19-34.
- Getchell, T.V. and Shepherd, G.M.: 1978a, 'Responses of olfactory receptor cells to step pulses of odour at different concentrations in the Salamander', *J. Physiol. (Lond.)*, **282**, 521-540.
- Getchell, T.V. and Shepherd, G.M.: 1978b, 'Adaptive properties of olfactory receptors analysed with odour pulses of varying durations', *J. Physiol. (Lond.)*, **282**, 541-560.
- Higashino, S., Takeuchi, H. and Amoore, J.E.: 1969, 'Mechanism of olfactory discrimination in the olfactory bulb of the bullfrog', in Pfaffmann, C. (ed.), *Olfaction and Taste III*, The Rockefeller University Press, New York, pp. 192-211.
- Holley, A. and Mac Leod, P.: 1977, 'Transduction et codage des informations olfactives chez les Vertébrés', *J. Physiol. (Paris)*, **73**, 725-828.
- Holley, A., Duchamp, A., Revial, M.F., Juge, A. and Mac Leod, P.: 1974, 'Qualitative and quantitative discrimination in the frog olfactory receptors: analysis from electrophysiological data', *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **237**, 102-114.
- Kauer, J.S.: 1974, 'Response patterns of amphibian olfactory bulb neurons to odour stimulation', *J. Physiol. (Lond.)*, **243**, 695-715.
- Mathews, D.F.: 1972, 'Response pattern of single neurons in the tortoise olfactory epithelium and olfactory bulb', *J. Gen. Physiol.*, **60**, 166-180.
- Meredith, M. and Moulton, D.G.: 1978, 'Patterned response to odor in single neurones of goldfish olfactory bulb: influence of odor quality and other stimulus parameters', *J. Gen. Physiol.*, **71**, 615-643.
- O'Connell, R.J. and Mozell, M.M.: 1969, 'Quantitative stimulation of frog olfactory receptors', *J.*

A.Duchamp and G.Sicard

Neurophysiol., **32**, 51-63.

Revial,M.F., Duchamp,A. and Holley,A.: 1978, 'Odour discrimination by frog olfactory receptor: a second study', *Chem. Senses*, **3**, 7-21.

Revial,M.F., Sicard,G., Duchamp,A. and Holley,A.: 1982, 'New studies on odour discrimination in frog's olfactory receptor cells. I. Experimental results', *Chem. Senses*, **7**, 175-190.

Revial,M.F., Sicard,G., Duchamp,A. and Holley,A.: 1983, 'New studies on odour discrimination in the frog's olfactory receptor cells. II. Mathematical analyses of electrophysiological responses', *Chem. Senses*, **8**, 179-194.

Van Drongelen,W., Holley,A. and Døving,K.B.: 1978, 'Convergence in the olfactory system: quantitative aspects of odour sensitivity', *J. Theor. Biol.*, **71**, 39-48.

Electrophysiological recordings from olfactory receptor cells in adult mice

G. SICARD

Laboratoire de Physiologie Neurosensorielle, Associé au C.N.R.S., Université Claude Bernard, Villeurbanne (France)

(Accepted 29 July 1986)

Key words: Olfactory receptor cell — Electrophysiology — Mouse

A new preparation for in vivo electrophysiological recording of olfactory receptor cell activity in the mouse is described. Receptor cells were characterized by their spontaneous activity and responses to odorants. These preliminary observations suggest that the olfactory receptor cells in mouse are more selective than receptor cells of the frog olfactory epithelium.

Most of the electrophysiological data on the olfactory receptor cells have been obtained from studies performed in amphibians^{1,2,5,6,7,9,14}. Gesteland and coworkers have presented examples of receptor cell activities collected from separated heads of young rats and rat embryos^{3,4}. Apart from these data there is no information about olfactory receptor cell properties of mammals. The present study describes a new preparation to extend this investigation to adult animals in more usual physiological conditions. We chose mice as experimental animals in the prospect of future studies on genetical aspects of olfactory perception.

We used 6–9-week-old male albino mice obtained from IFFA-CREDO (St Germain-L'Arbresle, France). The animals were anesthetized with sodium pentobarbital (50 mg/kg, i.p.) and maintained with supplemental doses as needed. The surgical procedures included a tracheal intubation in order to suppress respiratory air movements in the nasal cavity. The anesthetized mouse was fixed by head on a thermostatically controlled contention table (37 °C). The head was fixed on a 4-point support: the upper jaws reposed on a mouth piece; a posterior clamp fixed the head at the ear level; the skull was fastened to a rigid bar with Histoacryl (B. Braun, Melsungen, F.R.G.).

The dorsal skin and nasal bone above the right nasal cavity were successively removed. Finally the

dorsal epithelium of the nasal cavity was longitudinally incised and folded. During surgery the bleeding was cleared using a gauze tampon. When residual clots of blood were present on the mucosa, they were naturally removed by the mucus flow. The search for the units began 20 min after surgery. The access to the nasal cavity was 1.5 mm wide and 5 mm long, ending at the posterior suture of the nasal bone.

Olfactory stimulations were delivered in gas phase by a multichannel olfactometer which has been described in detail elsewhere⁹. The following compounds were used as stimuli: Acetophenone, anisole, camphor, cineole, cyclodecanone, cyclohexanone, *p*-cymene, heptanol, isovaleric acid, D-limonene, methyl amyl ketone, musk-ketone, cyclooctadecanone, usual aliment odor and litter odor. Except for the latter 4 stimuli, these odorants have been used in an olfactory receptor cell study performed in the frog⁹. For purpose of comparison, the odor concentrations and stimulus duration (2 s) were the same as in the frog study. To investigate concentration–response relationships, some odorants were occasionally delivered at several concentrations.

The extracellular unitary activity of receptor cells was recorded using platinum-black metal-filled microelectrodes (tip diameter 1–3 μ m, impedance 1–4 M Ω at 1000 Hz). The recording electrode was finely moved by a microdriver (UT 2050 PP, Micro-Con-

Correspondence: G. Sicard, Laboratoire de Physiologie Neurosensorielle, Associé au C.N.R.S., Université Claude Bernard, F-69622 Villeurbanne, Cedex, France.

trole; minimum step $0.1\ \mu\text{m}$). The contention plate and the microdriver were firmly fixed to a vibration-proof table. A reference chlorided silver electrode was inserted in the dermal nasal tissue.

The electrophysiological activity was amplified by a low noise amplifier (input impedance $500\ \text{M}\Omega$, bandwidth 300–3000 Hz). It was displayed on an oscilloscope, monitored on an audio system and stored on magnetic tapes. Tape recordings were transferred on to Gould ES 1000 chart recorder for subsequent analysis.

Preliminary recordings of electroolfactograms (EOG) indicated that responses to odorant stimulations could be recorded from the dorsal portion of the septal epithelium. These responses were similar to EOGs recorded in the frog. Anisole, methyl amyl ketone, cineole, cyclohexanone and *p*-cymene stimulations evoked EOGs whose amplitudes varied depending on recording site locations and preparations and could reach up to 2 mV. For the other available stimuli, amplitudes rarely exceeded 0.4 mV. Most of the preparations presented such unaltered responses for several hours.

The unitary activity of olfactory receptor cells was regularly encountered when descending in the septal area. In a few cases we could record unitary activity from the nasal turbinate. However, we restricted the investigation to the posterior septal olfactory epithe-

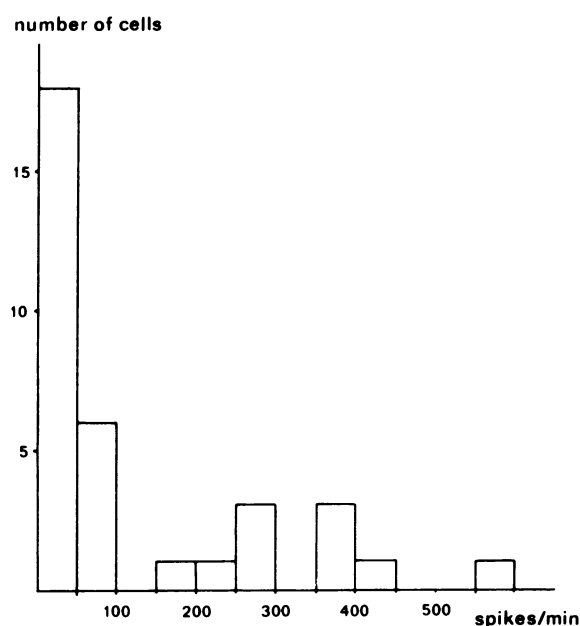


Fig. 1. Histogram of receptor cell spontaneous activity.

lium which is more accessible. This area seems more sensitive to the tested odorants as judged from the amplitudes of EOG responses, which could be related to a higher density of receptor cells in this part than in other explored areas.

Out of 100 observed units, 34 were recorded in similar experimental conditions and observed for

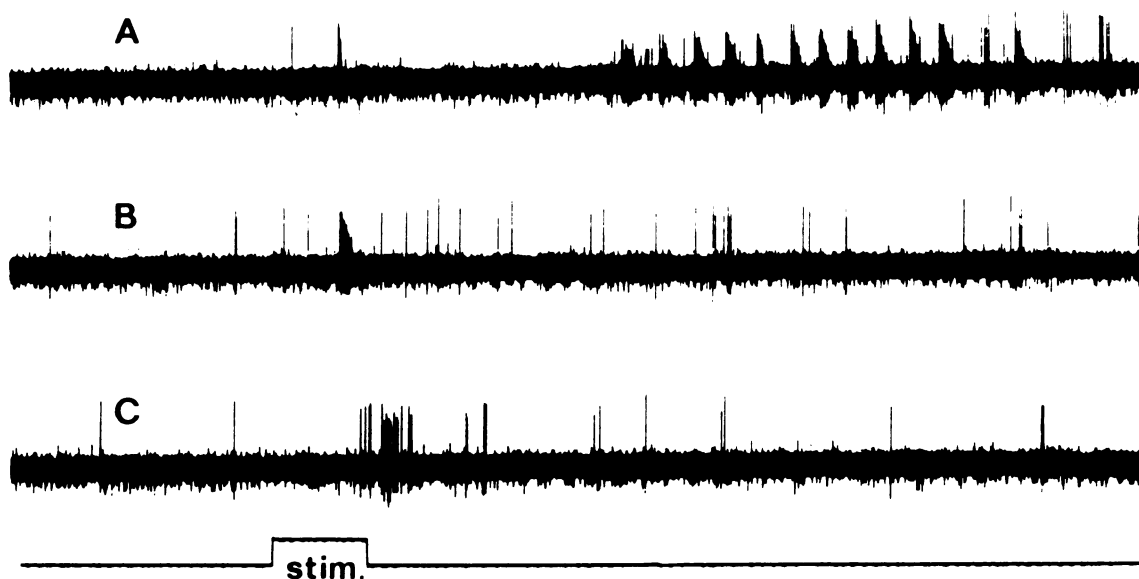


Fig. 2. Different response patterns elicited by olfactory stimulation of a single receptor cell. Odorants: A, anisole, B, cyclohexanone; C, *P*-cymene. Saturated vapor dilutions: A, 20%; B and C, 10%. Stimulus duration: 2 s.

more than 30 min up to 1 h 30 min. As observed in other preparations^{1,2,5,6,8-10,12,14}, the olfactory receptor cells displayed spontaneous activity. Most of the spikes showed a triphasic waveform resembling that of axon spikes described by Getchell⁵. Diphasic spikes were also observed. The spike duration was about 5 ms. The spontaneous spike emission was irregular and the mean firing rate appeared quite stable for long periods of time. More than 50% of the units displayed a spontaneous frequency rate which did not exceed 50 per minute (Fig. 1).

The spontaneous firing rate could be modified either by mechanical stimulation (i.e. electrode movements) or by odorant stimulation. Cells showing either low or high spontaneous activities were both responsive. The neural responses to odorant stimulations displayed different types of time pat-

terns, but all the observed responses showed an initial phase of increased firing (Fig. 2). The onset burst could be followed by a period of suppressed activity and subsequent bursts of spikes. We did not observe any initial suppressive effect of the stimulations. At the highest firing rates, the spikes gradually diminished in amplitude and disappeared sometimes for several seconds. The delay, the firing rate and the number of evoked spikes of the response were found to be functions of increasing stimulus concentration (Fig. 3). With increased concentrations, the response delay was progressively reduced while the firing rate was increased; the number of evoked spikes first increased and then, at higher concentration levels, spike amplitude decrement and modifications of the response time patterning were generally observed.

Among all stimulations performed in this study,

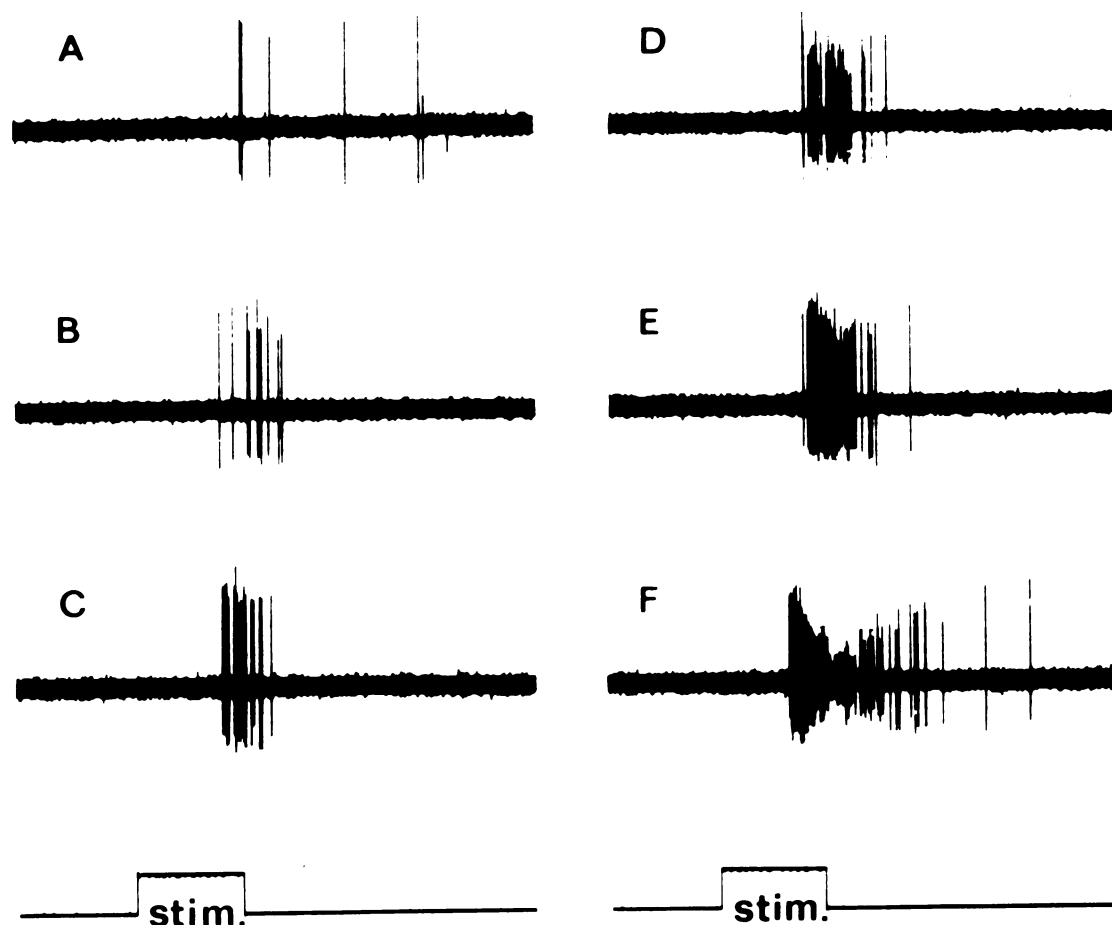


Fig. 3. An example of concentration-response relationship. Odorant: cyclohexanone. Saturated vapor dilutions: A, 4%; B, 7%; C, 12%; D, 15%; E, 18%; F, 25%. Stimulus duration: 2 s.

254 were made with odorants used in the frog at the same concentrations. Only 7.5% of them evoked identifiable responses from receptor cells which significantly differs ($\chi^2 = 99.6$, $\alpha < 0.01$) from the corresponding percentage (39%) in the frog. When those cells which gave no responses are withdrawn from the calculation, the responsiveness of the remaining sensitive cells becomes 26.5% whereas it was 55% in the frog study, ($\chi^2 = 15.0$, $\alpha < 0.01$).

The results of this preliminary study suggest that the mammalian olfactory receptor cells are more selective than those in amphibians. However, this conclusion must be considered critically. Because the morphology of the nasal cavity is noticeably different in the frog and in the mouse, the exposed epithelium was not similarly oriented with respect to the odorized flow in both preparations, which may have resulted in different odor concentration in the mucus surrounding the recorded cells. The seemingly high receptor selectivity may also be a sampling effect. In the mouse, the receptor cell responses were collected from a small portion of the epithelium whereas the explored area was comparatively larger in the frog.

Assuming a non-homogeneous spatial distribution of the epithelial chemosensitivity^{7,13} it is possible that the sensitivity spectrum of the explored area was not representative of that of the whole epithelium. Although the olfactory stimuli represented a large variety of molecular structures and odor qualities, one cannot exclude that the corresponding receptors were locally under-represented, which could explain the relatively low rate of units responding to the odorant sample.

In conclusion, in the mouse, the receptor cell unitary activity presents marked analogies with that described in other preparations, in terms of spontaneous activity and response patterns. The suggestion of a high selectivity of mammalian olfactory receptor cells will have implications for our understanding of odor discrimination in mammals. Further studies are now needed to substantiate this suggestion.

This work was supported by the Centre National de la Recherche Scientifique (GRECO- 'Sens chimiques'). The author received personal support from the Fondation Roudnitska.

- 1 Baylin, F., Temporal patterns and selectivity in the unitary responses of olfactory receptors in the tiger salamander to odor stimulation, *J. Gen. Physiol.*, 74 (1975) 17–36.
- 2 Duchamp, A., Revial, M.F., Holley, A. and MacLeod, P., Odor discrimination by frog olfactory receptors, *Chem. Senses Flavor*, 1 (1974) 213–233.
- 3 Gesteland, R.C. and Sigward, C.D., Olfactory receptor units. A mammalian preparation, *Brain Research*, 133 (1977) 144–149.
- 4 Gesteland, R.C., Yancey, R.A. and Farbman, A.I., Development of olfactory receptor neuron selectivity in the rat fetus, *Neuroscience*, 7 (1982) 3127–3136.
- 5 Getchell, T.V., Analysis of unitary spikes recorded extracellularly from frog olfactory receptor cells and axons, *J. Physiol. (London)*, 234 (1973) 533–551.
- 6 Getchell, T.V. and Shepherd, G.M., Responses of olfactory receptor cells to pulses of odour at different concentrations in salamander, *J. Physiol. (London)*, 282 (1978) 541–560.
- 7 Mackay-Sim, A., Shaman, P. and Moulton, D.G., Topographic coding of olfactory quality: odorant-specific patterns of epithelial responsivity in the Salamander, *J. Neurophysiol.*, 48 (1982) 584–596.
- 8 Mathews, D.F., Response patterns of single neurons in the tortoise olfactory epithelium and olfactory bulb, *J. Gen. Physiol.*, 60 (1972) 166–180.
- 9 Sicard, G. and Holley, A., Receptor cell responses to odorants: similarities and differences among odorants, *Brain Research*, 292 (1984) 283–296.
- 10 Shibuya, T. and Shibuya, S., Olfactory epithelium: unitary responses in tortoise, *Science*, 140 (1963) 495–496.
- 11 Shibuya, T. and Tucker, D., Single unit responses of olfactory receptors in vultures. In T. Hayashi (Ed.), *Olfaction and Taste, Vol. II*, Pergamon Press, London, 1967, pp. 219–233.
- 12 Shibuya, T. and Tonosaki, K., Electrical responses of single olfactory receptor cells in some vertebrates. In D. Schneider (Ed.), *Olfaction and Taste, Vol. IV*, Wissenschaftliche, Stuttgart, 1972, pp. 102–108.
- 13 Thommesen, G. and Döving, K.B., Spatial distribution of E.O.G. in the rat; a variation with odour quality, *Acta Physiol. Scand.*, 99 (1977) 270–280.
- 14 Trotier, T. and MacLeod, P., Intracellular recordings from salamander olfactory epithelium, *Brain Research*, 268 (1983) 225–237.

Comparison of the Sensitivity of C57BL/6J and AKR/J Mice to Airborne Molecules of Isovaleric Acid and Amyl Acetate

L. Pourtier¹ and G. Sicard¹

Received 21 June 1989—Final 12 Oct. 1989

Wysocki et al. (1977) have previously compared the abilities of several inbred strains of mice to avoid odorized drinks after odor-aversion conditioning and have proposed C57BL/6 mice as an animal model to study the specific anosmia to isovaleric acid. We have compared the olfactory performances of C57BL/6J mice and AKR/J mice using one-bottle and two-bottle tests to study the latencies of contacts with odorized or control drinks after odor-aversion conditioning. In both inbred strains, sensitivities to airborne molecules of amyl acetate (control odor) or isovaleric acid are demonstrated. Differences in behavioral strategies are suggested but the results are consistent with the hypothesis of a selective hyposmia to isovaleric acid in C57BL/6J mice.

KEY WORDS: mice; AKR/J; C57BL/6J; olfactory sensitivity; hyposmia; odor-aversion conditioning.

INTRODUCTION

A number of studies have used a flavor-toxicosis conditioning paradigm to test the abilities of animals to detect odor associated with food or drink and the various procedures have been discussed (Garcia and Koelling, 1967; Revusky et al., 1977; Rusiniak et al., 1979; Palminero et al., 1980; Van Burskirk, 1981; Bermudez-Rattoni et al., 1987). Wysocki et al. (1977) compared the abilities of inbred strains of mice to avoid isovaleric acid in drinking solutions. Fluid intake measurements made after odorant-aversion conditioning suggested that C57BL/6J mice are less sensitive to isovaleric acid than are a number of other

¹ Laboratoire de Physiologie Neurosensorielle, CNRS-UA 180, Université Claude Bernard-Lyon I, F-69622 Villeurbanne cedex, France.

inbred strains, including AKR/J mice. It was reported that C57BL/6J mice avoided the odorized solution after an initial lick only, while AKR/J mice were clearly sensitive to airborne molecules of isovaleric acid since they avoided the solution without tasting it. In addition, tests with other odorants (amyl acetate or pentadecalactone) showed that the deficit of C57BL/6J mice was restricted to isovaleric acid. The deficit shares characteristics with the "specific anosmia" previously identified in human subjects (Guillot, 1948; Amoore, 1967, 1982; Beets, 1982; Hirth *et al.*, 1986, Whissell-Buechy and Amoore, 1973).

Recent physiological studies (Troitskaya *et al.*, 1987; Sicard *et al.*, 1989) have established that the periphery of the olfactory system of C57BL/6J mice is sensitive to isovaleric acid vapors, at least at high concentrations. Thus, if C57BL/6J mice are fully anosmic to isovaleric acid, one may suppose that the reported deficit has a more central origin. In other respects, different inbred strains can show a number of different behavioral traits. Without direct involvement of olfactory sensitivity, behavioral variations can influence the variables used to compare two different strains.

In order to examine these possibilities, we have first attempted to find behavioral indications of the sensitivity of these mice to isovaleric acid vapors.

EXPERIMENT 1

We have reproduced and extended the experimental procedure described by Wysocki *et al.* (1977). Following odor-aversion conditioning, an increased latency of the initial contact of the mouse with the aversive odorized drink can be considered as the evidence that the odor is detected without any direct contact.

Animals and Methods

Adult male AKR/J and C57BL/6J mice were supplied by CSEAL-CNRS (Orleans, France) and IFFA-CREDO (Saint-Germain-L'Arbresle, France). The animals were housed in individual cages with a 12/12-h light/dark cycle. Housing and experiments were performed at a stabilized temperature, 25°C. Food and water were provided *ad libitum*. During a week before the experiments, the mice were submitted to a water-deprivation regime and were trained to drink in two periods of 5 min daily. Systematically, animals were placed in an observation cage and a calibrated pipette containing the drinking solution was introduced for 5 min. This schedule was maintained throughout the experiments. The experiments started after animal weight and fluid consumption stabilized. Timing of different phases of drinking behavior have been recorded by the observer using an adapted microcomputer and its internal clock.

The control drink was a water solution of saccharin ($2.1 \times 10^{-2} M$) buffered with phthalic acid ($10^{-3} M$). Aromatized solutions were made by dilution

(10^{-3} by volume) of the pure odorants in the control solution. For equilibration, the solutions were agitated during 24 h at 25°C before use. The calculated molar concentrations of the stock solution were 9×10^{-3} M for isovaleric acid and 7×10^{-3} M for amyl acetate. The odorants were reagent-grade chemicals (Merck) and purity of the solutions was checked by gas chromatography.

From each inbred strain, three groups of six animals were formed.

For the first group (C) the delay between the presentation of the control drink and the initial contact with the pipette was recorded for four successive testing trials (2 days).

For the other two groups [isovaleric acid (I), amyl acetate (AA)] the first ingestion of an aromatized solution was followed by an intraperitoneal injection of lithium chloride (0.6 M LiCl, 5 ml/kg). As demonstrated by previous experiments (Wysocki *et al.*, 1977), this procedure induces a clear avoidance of the flavored solution at the tested concentrations. Twenty-four hours later and during 2 consecutive days, the delay between the presentation of the drinking solution and the first contact of the animals with the pipette was recorded. In each experimental condition, recordings were made two times a day for 2 consecutive days for a maximum of 300 s. When mice did not make contact with pipettes, the value of 300 s was assigned. Median values were calculated for each mouse.

Results

In Fig. 1, animals are distributed in classes according to the values of the median delay calculated on four successive testing trials.

C57BL/6J mice reached the drinking tube with short delays in either the control or the experimental conditions. No statistical difference between the control and the experimental groups was detected (Mann-Whitney's test: C vs I, $U = 11.5$; C vs AA, $U = 12.5$).

A comparable delay was observed for AKR/J mice in the control condition. However, after odorant aversion conditioning, AKR mice clearly avoided contact with the aromatized tube for longer times (Mann-Whitney's test: C vs I, $U = 1$, $p < .001$; C vs AA, $U = 0$, $p < .001$). Two subjects of six for isovaleric acid and six of six for amyl acetate took more than 300 s to reach the pipette.

These results confirm the observations reported by Wysocki *et al.* (1977) that AKR/J mice are able to detect isovaleric acid without any first lick. This is not so for C57BL/6 mice. In this inbred strain, whatever the odorant, no change in latencies for drinking was observed.

The difference between the inbred strains might be due to a nonselective sensory deficit in C57BL/6J mice or, more probably, to different behavioral strategies.

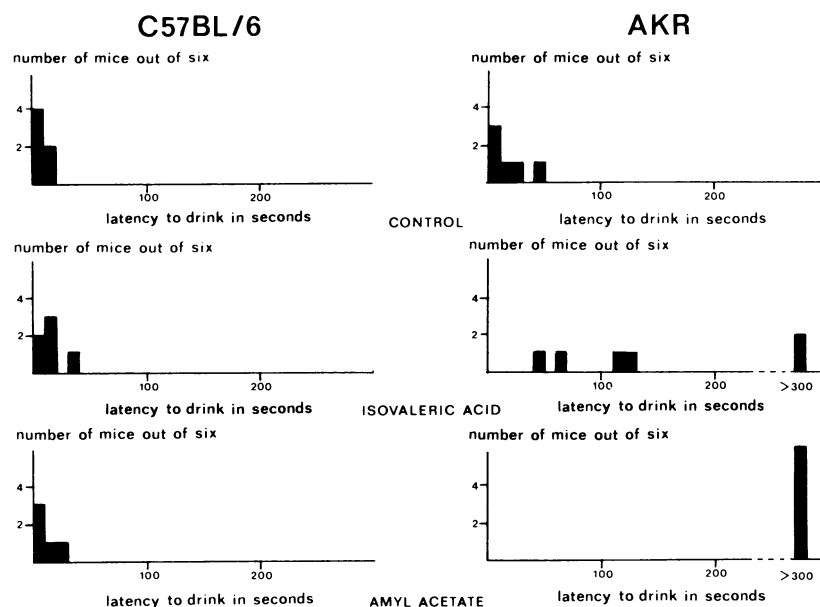


Fig. 1. One-bottle test. Effects of the odor-aversion conditioning on the delay between presentation of the bottle and initial contacts with the drinking solutions in thirsty C57BL/6J and AKR/J mice. Two different odorants have been used: amyl acetate and isovaleric acid (dilutions, 10^{-3} by volume).

EXPERIMENT 2

The second experiment was designed to explore the chemosensitivity of the mice. The previous procedure involved a conflict between the thirst motivation of the animals and their aversion to the odorized drink. This difficulty can be overcome by giving a choice between an odorized and a control solution to the animals.

Animals and Methods

The animals were kept as described above. As in the first experiment, the mice were trained to drink in restricted periods and conditioned to avoid the odorants in drinking solutions. However, two pipettes were simultaneously presented to the mice. Three groups of 12 animals each were formed from each inbred strain.

Two pipettes filled with identical control solutions were presented to the members of the first group and the latencies of the initial contacts with left and right pipettes were recorded.

In the experimental groups, aversion conditioning was obtained on Day 0 by an intraperitoneal injection of a saline solution of LiCl (0.6 M, 5 mg/kg) following the first presentation of two similar odorized pipettes. All the animals drank the odorized solution before toxin administration. Twenty-four hours later, a choice was offered between a pipette containing the odorized solution and another one containing the control solution. Latencies of the initial contacts with each of the pipettes were recorded.

The control solution was prepared as described in the previous experiment. Three concentrations of isovaleric acid and amyl acetate were successively tested: 10^{-3} (by volume) on days 2, 3, 6, 7, 10, and 11; 10^{-4} on days 4 and 5; and 10^{-5} on days 8 and 9. The retest of the highest concentration allowed assessment of any alteration of the avoidance reaction. The measurements were made twice on each day.

Results

The latencies following the presentations of the highest concentrations are reliable for 10 days at least. We saw no pronounced alteration of the delays comparing the first and the last experimental tests using the 10^{-3} solutions of either isovaleric acid or amyl acetate, in either strain. On day 2, individual median values for isovaleric acid were higher than 300 s in AKR/J and equal to 220 ± 89 s in C57BL/6J. For amyl acetate, they were 278 ± 49 s in AKR/J and 196 ± 119 s in C57BL/6J. On day 10, the corresponding values were, for isovaleric acid, 277 ± 76 s in AKR/J and 220 ± 89 s in C57BL/6J and, for amyl acetate, 283 ± 42 s in AKR/J and 116 ± 143 s in C57BL/6J. Using Wilcoxon's test, no significant differences were found between day 2 and day 10.

Regarding the effect of concentration, at the highest concentrations of the odorants (Figs. 2a, d), AKR/J mice made few or no contacts with the odorized drinks during the surveyed period. As the odorant concentrations were decreased, contacts with the odorized pipette became more frequent and their delays decreased. At the 10^{-5} levels (Figs. 2c, f), the graphs tend to reach the shapes of those obtained in the control situation (Fig. 3).

We have first compared the latencies of contacts with control pipettes (C) and odorized ones (I, isovaleric acid; or A, amyl acetate) using Wilcoxon's test.

In AKR/J mice, for isovaleric acid, differences between odorized and control pipettes are statistically demonstrated at 10^{-3} and 10^{-4} concentration levels but not at the lowest [C vs I(10^{-3}), $t=0$, $p<0.01$; C vs I(10^{-4}), $t=0$, $p<0.01$; C vs I(10^{-5}), $t=19$]. However, we can remark that even at this level 6 of 12 mice clearly avoided the odorized solution (Fig. 2c).

For amyl acetate, test latencies are still longer than control ones at the lowest concentration [C vs A(10^{-3}), $t=0$, $p<0.01$; C vs A(10^{-4}), $t=1$, $p<0.01$; C vs A(10^{-5}), $t=2$, $p<0.01$].

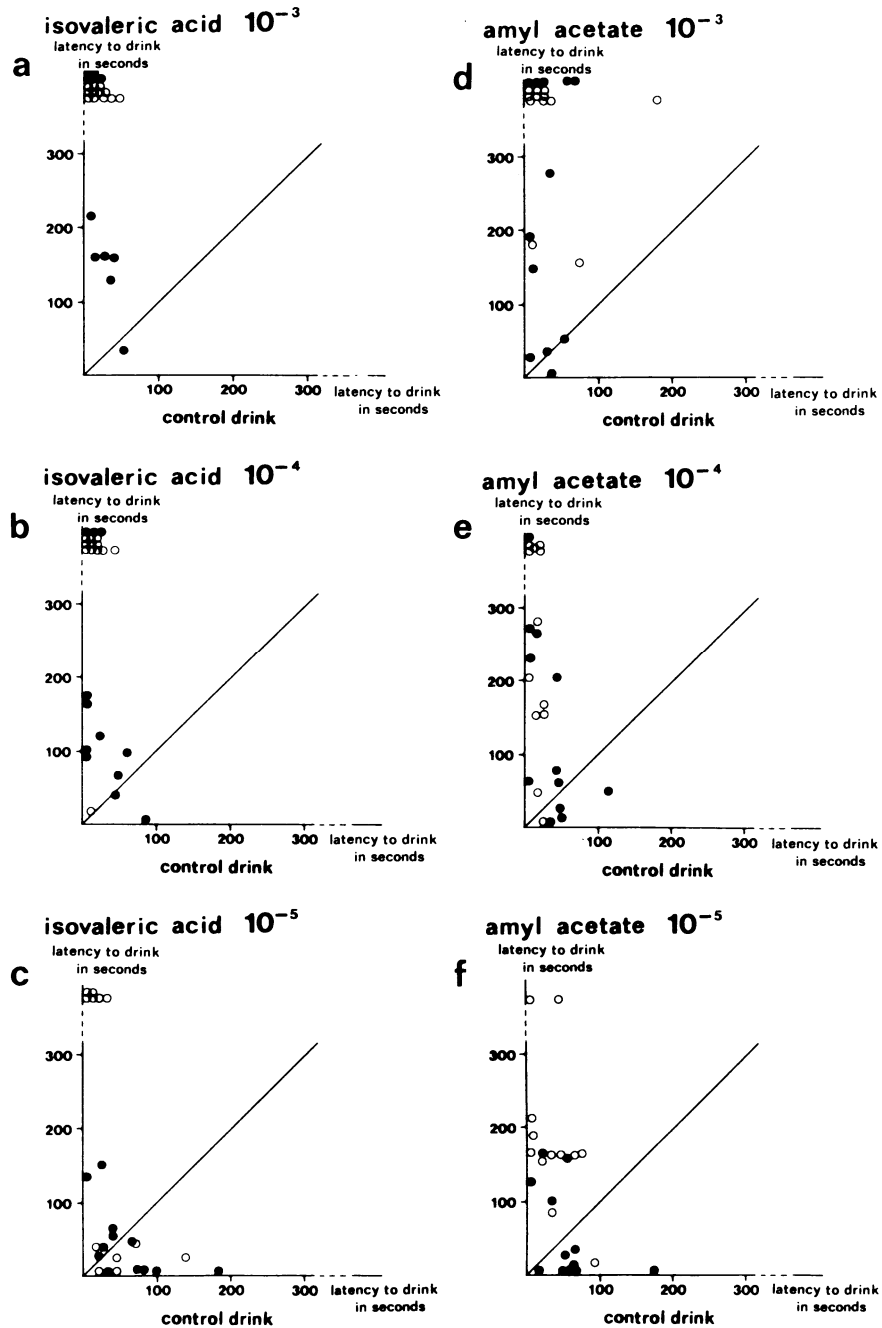


Fig. 2. Two-bottle test. Latencies of the initial contacts of C57BL/6J (filled circles) and AKR/J (open circles) mice with an aromatized pipette and a control one following odor-aversion conditioning. Three different dilutions (10^{-3} , 10^{-4} , and 10^{-5} by volume) of amyl acetate or isovaleric acid have been tested. The solid line corresponds to the first bisector of the plane. For isovaleric acid, in both strains, differences between control and odorized pipettes are observed at the highest concentrations (a, b) (Wilcoxon's test, $p < .01$) but not at the lowest (c). For amyl acetate, differences are observed in both strains (Wilcoxon's test, $p < .01$), except in C57BL/6J mice at 10^{-4} (e) and 10^{-5} (f).

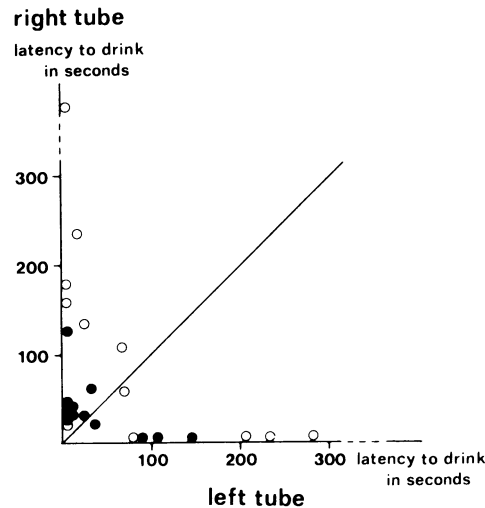


Fig. 3. Two-bottle test. Latencies of the initial contacts of C57BL/6J (filled circles) and AKR/J (open circles) mice with left and right bottles containing identical control solutions. The solid line corresponds to the first bisector of the plane.

In C57BL/6J mice, similar results are observed. However, according to the diagrams (Fig. 2), the avoidance seems globally less clear-cut.

For isovaleric acid, there are differences at the highest concentration levels [C vs I(10^{-3}), $t=1$, $p<0.01$; C vs I(10^{-4}), $t=4.5$, $p<0.01$; C vs I(10^{-5}), $t=33$]. At the highest level, 5 of 12 animals did not touch the odorized pipette during the observation period (Fig. 2a). Comparatively, in AKR/J mice, the avoidance was complete, the score being 12 of 12.

For amyl acetate, latencies of contacts with the odorized pipettes are significantly longer than latencies of contacts with control pipettes at the highest concentration level only [C vs A(10^{-3}), $t=5$, $p<0.01$; C vs A(10^{-4}), $t=15.5$; C vs A(10^{-5}), $t=36$]. Five of twelve animals totally avoided contact with the odorized pipette. The score was 10 of 12 in AKR/J mice. We see no statistical difference among latencies before contacts with odorized and control pipettes.

In the control condition, the median latencies were generally shorter than 300 s, except for one AKR/J mouse. In aversive conditions, we observed a variable number of complete avoidances of contact with the odorized pipette depending on the odorant concentration. Thus, we have grouped the animals into two classes: one including mice which made contact with the odorized pipette, and the other, mice which did not. We compared the distributions obtained in control conditions and aversion conditions using Fisher's exact prob-

ability test (Table I). For amyl acetate at the highest concentration and for both strains, there is a difference which is significant at the 5% level. For the lower concentrations, there are no significant differences for either strain. For isovaleric acid, there are significant differences for AKR/J mice at all tested concentrations, while C57BL/6J mice show a significant difference at the highest concentration only.

Figure 3 shows the distribution of the subjects according to the delays recorded in the control condition for left and right pipettes. Median values from four successive testing trials are shown. The distribution for either strain is symmetrical. In AKR/J mice, short latencies for one pipette are associated with long latencies for the other. This indicates that individual AKR often select one pipette, rarely using the other. However, there is no significant difference between the sides (Wilcoxon's test). Thus, statistically, in the absence of a difference between the drinks, the mice do not display an oriented choice.

DISCUSSION

Nasal chemosensitivity in mammals is multimodal, involving the olfactory, trigeminal, and vomeronasal systems (Tucker, 1971; Doty *et al.*, 1978; Walker *et al.*, 1979; Silver *et al.*, 1988). Odorants dissolved in drinking solutions can also be detected by olfactory cues. Both inbred strains can avoid the highest concentration of amyl acetate or isovaleric acid without licking the odorized tube. One can therefore suppose that isovaleric acid odor is detected by both strains. Nevertheless, the mechanism responsible for avoidance of aromatized drinks is not fully revealed in the present study. We have shown that gustatory

Table I. Analysis of the Distributions of the Mice According to the Presence or Absence of Contacts with the Odorized Pipettes [Fisher's Exact Probability Test ($p > 0.05 = \text{ns}$)]

	C57BL/6			AKR		
	Contact	No contact	<i>p</i>	Contact	No contact	<i>p</i>
Control	12	0		11	1	
Amyl acetate						
10^{-3}	7	5	<.02	2	10	<.01
10^{-4}	11	1	>.05	7	5	>.05
10^{-5}	12	0	>.05	10	2	>.05
Isovaleric acid						
10^{-3}	7	5	<.02	0	12	<.01
10^{-4}	9	3	>.05	1	11	<.01
10^{-5}	12	0	>.05	6	6	<.05

cues are not necessary, but a participation of trigeminal chemosensory detection cannot be ruled out. We can, however, remark that trigeminal thresholds are generally considered to be higher than olfactory thresholds (Tucker, 1971; Walker *et al.*, 1979; Silver *et al.*, 1988).

The latency measurements in the second experiment indicate that the higher the concentration of the tested odorant, the larger are the behavioral responses. As different concentrations have been successively tested, the observed relationship might be related to a possible extinction of the aversion with repetitions. However, we have confirmed that odor-aversion conditioning is long-lasting (Rusiniak *et al.*, 1979; Van Buskirk, 1981). Thus, one cannot look to this hypothesis to explain the observed relationship. The variations are more likely to be related to sensory evaluation, the performance of the mice being facilitated by unambiguous stimuli.

Analyzing the occurrence of contacts with odorized and control pipettes, we have noticed that detection of isovaleric acid is not seen at similar concentrations in the two strains. This result is congruent with those obtained by Wysocki *et al.* (1977) testing other parameters. Following the preceding remarks, a selective sensory (olfactory) deficit in C57BL/6J mice might be suggested.

In other respects, several observations indicate that different behavioral strategies characterize the two strains. Considering the diagram corresponding to the control situation in the second experiment, one can observe that C57BL/6J mice reached the pipettes in shorter times than did AKR/J mice (Mann-Whitney's test, $U=11.5$, $p<0.05$). This result could be related to a greater general activity or depend on more complicated behavioral characteristics.

Differences in behavioral traits are illustrated by the first experiment reported here. In the one-bottle test, it is shown that delays of drinking are not affected by the aversion conditioning in C57BL/6J mice. This observation contrasts with the features observed in AKR/J mice, which put off their initial contacts with the odorized drinks. The difference is not odorant specific and might be interpreted in terms of an unselective sensory deficit rather than a selective one. As the tested drinks were delivered at identical concentrations and clearly avoided in the second experiment, their aversive character for C57BL/6J mice is not questionable. Indeed, the preliminary experiment demonstrates that the conflict between thirst and aversion is solved differently by C57BL/6J and AKR/J mice.

Focusing on the second experiment, we have retained two aspects of the same behavioral response to test the association between odor and aversion. As previously done (Wysocki *et al.*, 1977; Rusiniak *et al.*, 1979), we have compared the latencies of the initial contacts with control or odorized pipettes. In addition, we have scored the numbers of mice which touched the odorized

pipettes during the observation period and compared the values with the values obtained in control conditions. The results of the two comparisons are not strictly identical even though not contradictory.

A mouse can touch the pipette without drinking. Contacts with pipettes do not necessarily reflect ingestion of drink but can be only informational. This is probably the case for one AKR/J mouse in Fig. 2b: despite an early contact with the odorized pipette, the mouse did not drink a measurable quantity of the odorized solution, which indicates that it had certainly identified the aversive solution. One cannot decide whether this particular animal was able to smell the source or not. Similar features have been noticed in C57BL/6J mice.

A complete avoidance of the odorized pipette appears to be a more suitable criterion. Whatever the strain, only some of the tested mice displayed a reliable avoidance during four successive trials.

Therefore, in this case also, the avoidance appears statistical in nature. Individual variations might be related to different states of motivation. Moreover, the contribution of physiological fluctuations cannot be ignored. Temporary nasal obstructions or variations of secretory activities of the olfactory mucosa may be involved (Getchell *et al.*, 1984). At near-threshold intensities of the stimulus, their influences can alter the detection abilities and consecutively modify the conditions of the choice.

These individual variations as well as behavioral differences partly explain why it is difficult to show differences of olfactory sensitivity between inbred strains (Novikov, 1989). Nevertheless, the present results are consistent with the hypothesis of a selective olfactory deficit in C57BL/6J mice (Wysocki *et al.*, 1977). These new behavioral results are in accordance with recent physiological findings which have revealed that the olfactory mucosa and olfactory bulb of C57BL/6J mice are activated by isovaleric acid delivered at high concentrations (Troitskaya *et al.*, 1987; Sicard *et al.*, 1989). In these studies, qualitative and quantitative alterations of the responses to stimulations by isovaleric acid have been observed in the olfactory system of C57BL/6J mice. Adding these facts to the present findings, it is difficult to believe that the suggested deficit of C57BL/6J mice can result from a total inability of these animals to detect this chemical via the olfactory system. More reasonably, a partial deficit of the olfactory system can be supposed and can be termed "selective hyposmia." Further, the data are compatible with the hypothesis that a type of selective receptor is missing in the olfactory mucosa of C57BL/6J mice (Guillot, 1948; Amoore, 1967; 1982; Beets, 1982; Sicard *et al.*, 1989). Whatever the case, the analyzed system may provide fruitful genetic insights into mechanisms of olfaction.

REFERENCES

- Amoore, J. E. (1967). Specific anosmia: A clue to the olfactory code. *Nature* **214**:1095-1098.
- Amoore, J. E. (1982). Odor theory and odor classification. In Theimer, E. T. (ed.), *Fragrance Chemistry*, Academic Press, New York, London, pp. 27-76.
- Beets, M. G. J. (1982). Odor and stimulant structure. In Theimer, E. T. (ed.), *Fragrance Chemistry*, Academic Press, New York, London, pp. 77-122.
- Bermudez-Rattoni, F., Coburn, K. L., Fernandez, J., Chavez, A. F., and Garcia, J. (1987). Potentiation of odor by taste and odor aversions in rats are regulated by cholinergic activity in dorsal hippocampus. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **265**:553-559.
- Doty, R. L., Brugger, W. E., Jurs, P. C., Orndorff, M. A., Snyder, P. J., and Lowry, L. D. (1978). Intranasal trigeminal stimulation from odorous volatiles: Psychometric responses from anosmic and normal humans. *Physiol. Behav.* **20**:175-185.
- Garcia, J., and Koelling, R. A. (1967). A comparison of aversion induced by X-rays, toxins and drugs in the rats. *Radiat. Res. Suppl.* **7**:439-450.
- Getchell, T. V., Margolis, F. L., and Getchell, M. L. (1984). Perireceptor and receptor events in vertebrate olfaction. *Prog. Neurobiol.* **23**:317-345.
- Guillot, M. (1948). Anosmie partielle et odeurs fondamentales. *C.R. Acad. Sci. Paris.* **226**:1307-1309.
- Hirth, L., Abadianian, D., and Goedde, H. W. (1986). Incidence of specific anosmia in Northern Germany. *Hum. Hered.* **36**:1-5.
- Novikov, S. N. (1989). *Pheromones et Reproduction des Mammiferes. Aspects Physiologiques*, Institut de Physiologie I.P. Pavlova, Sciences, Leningrad.
- Palmerino, C. C., Rusiniak, K. W., and Garcia, J. (1980). Flavor-illness aversions: The roles of odor and taste in memory for poison. *Science* **208**:753-755.
- Revusky, S., Parker, L.A., Coombes, J., and Coombes, S. (1977) Flavor aversion learning: Extinction of the aversion to an interfering flavor after conditioning does not affect the aversion to the reference flavor. *Behav. Biol.* **19**:171-188.
- Rusiniak, K. W., Hankins, W. G., Garcia, J., and Brett, L. P. (1979). Flavor-illness aversions: Potentiation of odor by taste in rats. *Behav. Neur. Biol.* **25**:1-17.
- Sicard, G., Royet, J. P., and Jourdan, F. (1989). A comparative study of 2-deoxyglucose patterns of glomerular activation in the olfactory bulbs of C57BL/6J and AKR/J mice. *Brain Res.* **581**:325-334.
- Silver, W. L., Arzt, A. H., and Mason, J. R. (1988). A comparison of the discriminatory ability and sensitivity of the trigeminal and olfactory systems to chemical stimuli in the tiger salamander. *J. Comp. Physiol. A* **164**:55-66.
- Troitskaya, V. T., Gladysheva, O. S., and Novikov, S. N. (1987). Specific anosmia to isovaleric acid in the peripheral part of the olfactory analyser in laboratory mice. *Neirofiziologiya* **19**:133-135.
- Tucker, D. (1971). Non olfactory responses from nasal cavity: Jacobson's organ and trigeminal system. In Beidler, L. M. (ed.), *Handbook of Sensory Physiology, Vol. IV/1*, Springer, Berlin, Heidelberg, New York, pp. 151-181.
- Van Buskirk, R. L. (1981). The role of odor in the maintenance of flavor aversion. *Physiol. Behav.* **27**:189-193.
- Walker, J. C., Tucker, D., and Smith, J. C. (1979). Odor sensitivity mediated by trigeminal nerve in pigeon. *Chem. Senses* **4**:107-116.
- Whissell-Buechy, D., and Amoore, J. E. (1973). Odor blindness to musk: Simple recessive inheritance. *Nature* **242**:271-273.
- Wysocki, C. J., Whitney, G., and Tucker, D. (1977). Specific anosmia in the laboratory mouse. *Behav. Genet.* **7**:171-188.

Edited by D. A. Blizard

Research Reports

Specificity of spatial patterns of glomerular activation in the mouse olfactory bulb: computer-assisted image analysis of 2-deoxyglucose autoradiograms

J.P. Royet¹, G. Sicard¹, C. Souchier² and F. Jourdan¹

¹Laboratoire de Physiologie neurosensorielle, UA CNRS 180, Université Claude-Bernard, Villeurbanne (France) and

²Centre commun de Quantimétrie, Lyon (France)

(Accepted 16 December 1986)

Key words: Olfactory glomerulus; Mouse; 2-Deoxyglucose (2-DG); Computer-assisted image analysis

We have developed a computer-assisted method for analyzing the 2-deoxyglucose (2-DG) autoradiograms of mice olfactory bulbs. The purpose of the study was to numerize the maps of glomerular activation in order to achieve a statistical comparison of the glomerular patterns evoked by different stimuli. The spatial distribution of glomerular activation was displayed on unfolded representations of the glomerular layer which were built up using glomerular optical densities (OD) measured systematically within 13 sections per bulb. Each bulbar sample was converted into an 'OD profile'. A matrix composed of 18 OD profiles was submitted to a principal component analysis. The first factor which accounted for 28% of the variance separated unambiguously two clusters corresponding to the bulbs issued from animals stimulated with amyliacetate and isovaleric acid, respectively. The second and third factors which accounted for 14% and 12% of the variance segregated the control group (animals exposed to pure air) from the odor-stimulated ones. It was demonstrated that the cluster separation was actually due to the specific spatial distribution of the most-labelled glomeruli. A particular attention was paid to the well-delineated glomerular activation evoked by isovaleric acid. The results demonstrate the specificity and reliability of the glomerular 2-DG patterns. The method should be useful for further comparisons of patterns elicited by larger sets of odorant compounds.

INTRODUCTION

The neuroanatomical 2-deoxyglucose (2-DG) method^{14,24} has proven very fruitful for investigating the spatial dimension of neuronal activity in sensory systems. In the olfactory system of mammals, a spatially organized activation of the glomerular layer has been shown to occur following olfactory stimulation^{9,10,23,26}. The most-labelled glomeruli were not distributed at random and their activation patterns could be visualized on three-dimensional bulbar reconstructions¹⁰. In order to study the topographical characteristics of these glomerular patterns, most authors used two-dimensional representations of the

spread-out glomerular layer^{1,2,9,23,26}. In every case, the most-labelled areas were delineated so that their extension and localization could be visually estimated. However, this procedure implied the arbitrary choice of optical density thresholds for selecting the glomeruli considered as significantly labelled. The computer-assisted method proposed by Kauer et al.¹² used a systematic scanning of the glomerular layer and provided pseudo 3-dimensional representations of labelling on the unfolded glomerular surface. However, none of these methods provided the opportunity of comparing the 2-DG patterns with appropriate statistical controls. The purpose of this work was to develop a computer-assisted analysis of

Correspondence: J.P. Royet, Laboratoire de Physiologie neurosensorielle, UA CNRS 180, Université Claude-Bernard, 69622 Villeurbanne Cedex, France.

the 2-DG autoradiograms so that the glomerular 2-DG patterns evoked by different odorants could be statistically compared in reliable and time-saving conditions. This study was performed in adult male mice.

MATERIALS AND METHODS

Olfactory stimulation device

The exposure of adult mice to olfactory stimuli was achieved by placing mice into cylindrical lucite cages which were built according to the model developed by Vigouroux and Royet²⁸. A stream of purified air was warmed to 25 °C and odorized by passing through a flask containing the pure odorant compound. The air flow was permanently monitored with a flowmeter and maintained at a rate of 10 liter/min. The odorized air, flowing down from the top of the cage, was made laminar with an appropriate teflon grid so that the odor concentration was evenly distributed within the cage. The odor concentration was calculated using the values of the flow rate and of the weight loss of the odorant-containing flask. The airstream was evacuated at the bottom of the cage. The floor was made of a coarse grid so that the droppings could be easily removed.

2-Deoxyglucose procedure

Twelve adult mice (C57/BL6) were used in this study. Each animal was first exposed for 30 min to pure air within the exposure cage. Then, it was given an i.p. injection of 15 μ Ci of 2-[¹⁴C]DG (CEA, France) diluted in 0.2 ml of sterile saline. Immediately after the injection, each animal was placed alone into the exposure cage and submitted to an intermittent stimulation (odor 5 min/pure air 5 min). Four animals were submitted to isovaleric acid (mean concentration = 3.5×10^{-6} M) while 4 others were exposed in the same conditions to amylacetate (mean concentration = 6.5×10^{-6} M). The total exposure lasted 45 min. The last 4 animals have received pure air during the 45 min following the 2-DG delivery. At the end of the stimulation, each animal was killed by decapitation and the brain was rapidly removed and frozen into isopentane cooled to -50 °C with liquid nitrogen. The olfactory bulbs were cut into serial sections, 20 μ m thick, at -17 °C, in a motorized cryostat. Then the sections were picked up on 60 °C warmed

glass slides and put in close contact with radiographic films (Kodak, DEF 5) into Kodak X-ray cassettes. Following a 7-day exposure at 4 °C, the films were conventionally processed while the sections were stained with Cresyl violet.

Image-analysis system

The analysis of the autoradiograms was carried out with the aid of a Quantimet 900 image analyser (Cambridge Instruments). The video camera, fitted out with a plumbicon tube, was placed upon a Zeiss universal microscope. The slides and autoradiograms were observed through a Luminar Zeiss macroobjective (40 mm). The illuminating light had been previously processed with a Zeiss condenser and a meniscus lens of -8.5 dioptries. The entire optic system gave a magnification of 50.44 with each pixel corresponding to a 5.97 μ m sided square. The final homogeneity of the light within the observation field was controlled by a shading correction monitored by a preprogrammed control routine. The first analytic routine was for the calibration of optical density (OD) measurements. The background of the film (maximum transmitted light), a mask (no transmitted light) and a reference filter of known optical density (0.92) were used to compute the *K* and *C* values in the simple equation relating the grey level values (*G*) to the transmitted light (*T*)

$$G = KT + C$$

The conversion of grey levels into optical densities was achieved by a preprogrammed routine which was stored at the beginning of each analysis session.

Optical density measurements

Thirteen sections, systematically distributed along the anteroposterior axis, and the corresponding autoradiograms, were analyzed in each olfactory bulb. The sampling interval (10 sections) was calculated so that each glomerulus could not be measured twice, according to Weibel's model for analyzing spherical units^{29,30}. The OD measurements were done as follows: first, the stained section to be measured was placed under the microscope and its outlines were automatically selected and stored in the computer memory. Second, the glomerular layer was delineated on the monitor screen with a light pen and

stored. In order to minimize geometrical distortions during the reconstruction of the glomerular layer map, we chose the median border of the section and the dorsal pole of the glomerular layer as geometrical references. Since the median bulbar surface approximates a plan, the orientation of the sections is assumed to be constant. Then, the stained section was removed and replaced by the corresponding autoradiogram which was carefully aligned with the section outlines. The grey levels of the film were stored and converted in OD values by calling the calibration

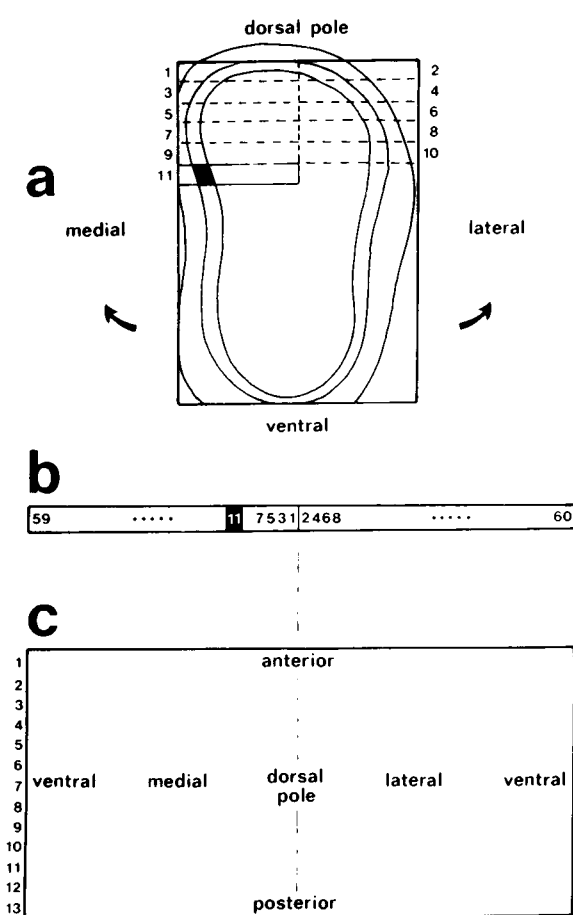


Fig. 1. OD measurements in the glomerular layer and spread-out representation of the glomerular labelling. (a): sampling of glomerular OD values at one sectioning level. A rectangular frame scanned automatically the autoradiogram in positions 1, 2, 3 . . . etc. OD measurements were done in the areas intersecting the frame and the stored outlines of the glomerular layer. (b): alignment of OD values on both sides of the dorsal pole. (c): thirteen sections were analyzed in each olfactory bulb. The corresponding OD values were arranged with reference to the dorsal poles which were aligned vertically. The resulting numerical matrix built up a spread-out representation of the glomerular labelling.

routine. Fig. 1a illustrates the next procedure. A live frame, 120- μ m height, was automatically displaced from the dorsal to the ventral pole of the bulbs, alternatively in left and right sides with respect to the dorsoventral axis. For each position of the frame, the mean OD value was calculated inside the outlines of the glomerular layer and stored into the computer memory. Thus, we obtained for each autoradiogram a range of glomerular OD values whose number depended on the size of the section. All data were stored in memory for further statistical analysis. One bulb per animal was analyzed in such a way. Moreover, 3 olfactory bulbs issued from different animals, each belonging to one of the experimental groups (stimulated with isovaleric acid, amylacetate or pure air, respectively), were processed twice in two different analysis sessions. Finally, 3 animals, each belonging to one of the groups, had their two symmetrical bulbs analyzed. As a consequence of the experimental procedure, we obtained 18 sets of OD values issued from 12 animals (12 subjects + 3 duplicate analysis + 3 symmetrical bulbs).

Standardization of optical density values

The original 2-DG method proposed by Sokoloff et al.²⁴ is adequate for measuring the rate of glucose utilization in brain tissue. However, numerous authors developed simplified applications of the method in order to estimate local alterations of functional activity. For example, the 'semiquantitative' method using OD ratios as normalized data proved reliable under controlled experimental conditions^{4,17,22}. In the present study, our purpose was to compare patterns of 2-DG accumulation within a pseudo two-dimensional nervous structure (the glomerular layer) which could be considered as homologous from one animal to another. As a consequence, the spatial coordinates of the areas of relative highest 2-DG uptake were relevant parameters while the absolute amplitude of 2-DG uptake and optical densities were not. Thus, each set of glomerular OD values representing one olfactory bulb could be considered as an 'OD profile' which was specified by its shape. Finally, the spread-out reconstruction of glomerular patterns and the statistical comparison of OD profiles could be achieved using data which were standardized into normalized Z-scores according to the following transformation

$$X_s = \frac{X_o - \bar{X}}{\sigma}$$

where \bar{X} was the mean bulbar OD value and σ the standard deviation.

This transformation resulted in homogeneizing the individual means and variance of OD. In other words, the absolute levels of OD profiles were equalized to have a mean of zero and standard deviation of one OD unit without affecting their individual shape specificities.

Spread-out surface reconstruction of the 2-deoxyglucose glomerular labelling

In order to visualize the 2-DG glomerular patterns, two-dimensional representations of the unfolded glomerular layer were achieved. For each autoradiogram, the standardized OD values (max: 60 values) measured on the lateral and medial aspects of the bulbs were aligned on both sides of a reference point given by the dorsal pole of the bulb (Fig. 1b). When the procedure had been performed upon each of the 13 autoradiograms, all the reference points were aligned vertically so that the numerical matrix obtained by this way took into account the coordinates of each value (Fig. 1c).

In order to facilitate the visual estimation of 2-DG glomerular patterns, a graphic representation of OD values was achieved. Thus, each map made of standardized OD values was converted into a graphic one. Numerical data were grouped into 10 classes (numbered from 0 to 9, Fig. 2a), each of them being symbolized by a square whose side was proportional to the rank of the class. As a result, we obtained a two-dimensional unfolded representation of the glomerular layer where the most-labelled areas were indicated by the presence of the largest squares (Fig. 2b).

Statistical comparison of 2-deoxyglucose glomerular patterns

The purpose of this study was to achieve the statistical comparison of a set of 2-DG glomerular patterns, looking for a possible correlation between the odorant quality and the spatial features of glomerular activation. First, the standardized numerical data issued from each olfactory bulb were aligned in a vector profile taking in account the coordinates of each



Fig. 2. Visualization of 2-DG glomerular patterns. The OD values arranged as shown in Fig. 1c were grouped within 10 classes numbered from 0 to 9 (a). A graphic representation was achieved by replacing the numerical values by squares of relative sizes (b).

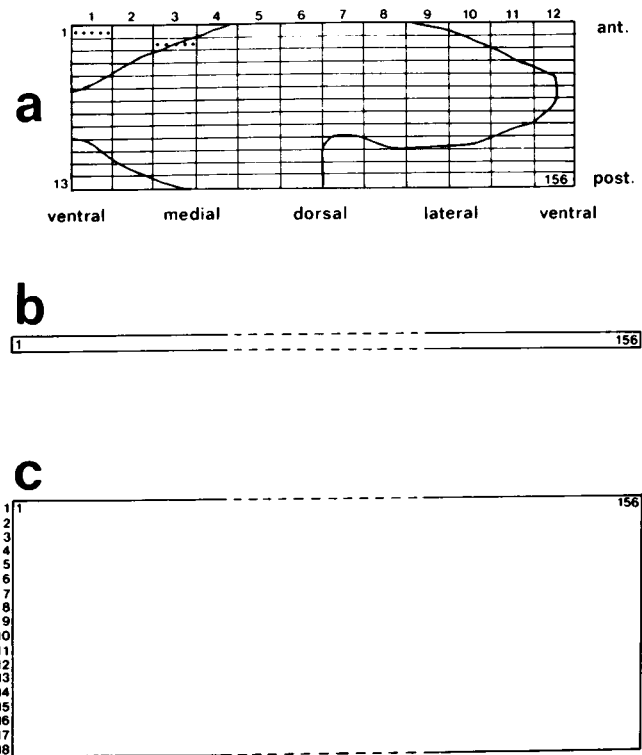


Fig. 3. Transformation of the spread-out representations into bulbar OD profiles. (a): each 5 successive OD values were grouped and their mean calculated. As a result, we obtained a matrix made of 156 values representing the whole glomerular labelling. (b): the 156 values were aligned into a vector profile. (c): eighteen OD profiles were arranged into a final matrix which was submitted to a principal component analysis.

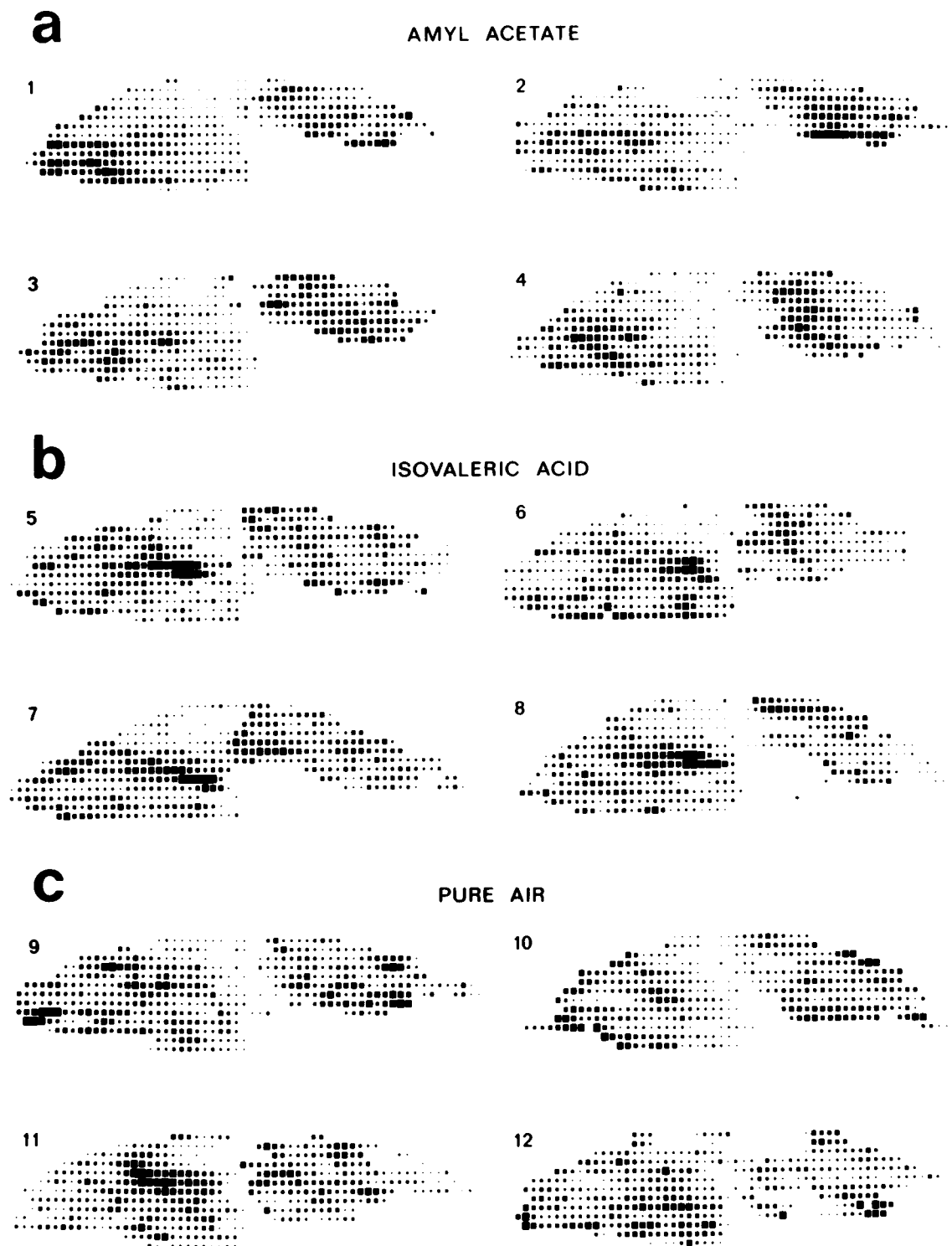


Fig. 4. Spread-out representations of 2-DG glomerular labelling in the olfactory bulbs of mice stimulated with amylacetate (a), isovaleric acid (b) or pure air (c) respectively. As shown in (c) the medial aspect has been systematically spread out on the left of the map. The most labelled areas are represented by the largest squares.

value. In order to do this, each two-dimensional map was transformed to a matrix composed of 13 lines (corresponding to the 13 sectioning levels) and 12 columns (Fig. 3a). The number of data within each line was reduced from 60 to 12 by calculating the mean of every 5 successive values. When some data were lacking at the border of the map, the mean was calculated only with the actual measurements. As a consequence, each bulb produced a topographical map consisting of 156 OD values aligned in a vector profile (Fig. 3b). The values obtained from each of the 12 animals were grouped in another matrix composed of 18 lines (number of sampled bulbs) and 156 columns (number of values per sample) (Fig. 3c). The resulting matrix is thus formed by quantitative homogeneous variables, i.e. standardized ODs. In order to compare the individual OD profiles, we have used a principal component analysis based on the evaluation of latent roots and vectors of the dispersion matrix formed from the comparisons between the variables⁶. Because of the constraints of the statistical test, all of the columns where one or several measurements were lacking had to be suppressed.

RESULTS

Spatial distribution of 2-deoxyglucose labelling

Fig. 4 shows the spread-out surface reconstructions of glomerular labelling obtained from 12 animals stimulated with amylacetate (4 animals, Fig. 4a), isovaleric acid (4 animals, Fig. 4b) or pure air (4 animals, Fig. 4c) respectively. Considering each of the experimental groups, one can observe important interindividual variations. Nevertheless, a specific topographical organization of the glomerular activation is visible in the medial aspects of the odor-stimulated bulbs. All the olfactory bulbs belonging to animals stimulated with isovaleric acid show a typical strong labelling located in the dorsomedial area, approximately in the middle part of the anteroposterior axis. The patterns induced by amylacetate are much more scattered but mainly concern the ventromedial area of the posterior half and the lateral aspect of the bulb. Though not being exactly similar within each experimental group, the glomerular 2-DG patterns observed in the medial bulbar aspects appeared odor-specific in such a way that their identification by

a simple visual inspection proved very easy. A fact of particular interest is the restricted area of the well-delineated labelling specific of isovaleric acid stimulation. No clear topographical organization of the metabolic activation can be visually correlated with odorant quality in the lateral aspect of the bulbs although the lateral glomeruli appeared as much more sensitive to amylacetate than they were to isovaleric acid.

The glomerular maps issued from animals which have been exposed to pure air display an obvious heterogeneity of glomerular labelling (Fig. 4c). In spite of the presumed lack of odor in the afferent airstream, a differential glomerular activation can be observed. However, it must be emphasized that the OD values had been standardized and that the size of the squares is not proportional to the absolute OD values. It has been shown previously that localized slight increases of glomerular labelling could occur in animals stimulated with pure air^{9,23,26}. The maps issued from control animals may represent the spatial distribution of such heterogeneity. Furthermore, the variability of the spatial distribution of labelling appears as far greater in the control group than it was in the odor-stimulated ones. Except in one case (Fig. 4c, no. 11), no clear pattern can be visually defined.

Multivariate analysis of 2-deoxyglucose patterns

A principal component analysis was applied to the numerical profiles of glomerular labelling obtained from the two experimental groups and the control one. A 3-dimensional mapping of the 18 profiles was achieved in the space defined by factors 1, 2 and 3 derived from principal component analysis (Fig. 5). The multidimensionality of the space reflects multiples sources of variance. The first factor which accounted for 28% of the variance segregated unambiguously two clusters corresponding to the two experimental groups stimulated with amylacetate (profiles 1–4) and isovaleric acid (profiles 5–8). The second and third factors which accounted for 14% and 12% of the variance, respectively, separated the animals stimulated with pure air (profiles 9–12) from those which were submitted to an odor (profiles 1–8). Furthermore, the principal component analysis did not separate neither the bilateral measurements (R vs L), nor the successive measurements achieved on the same bulb during different analysis sessions

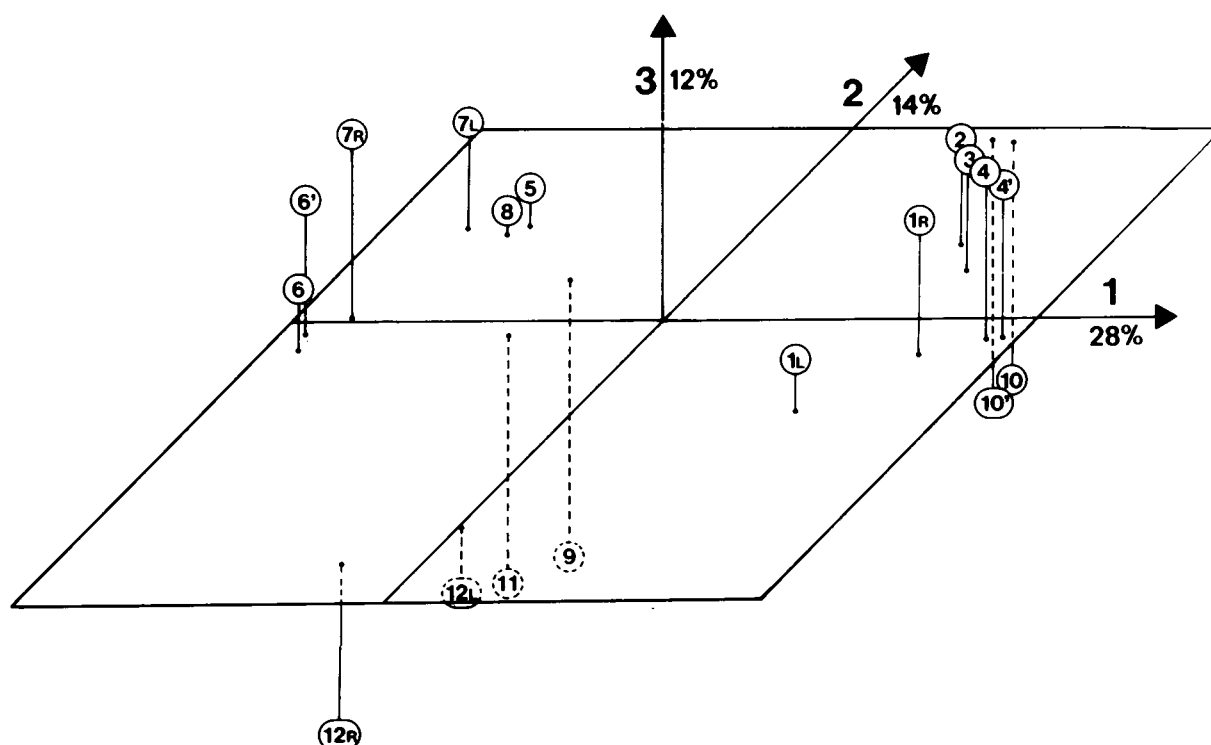


Fig. 5. Three-dimensional mapping of the 18 glomerular OD profiles in the space defined by factors 1, 2, 3 derived from the principal component analysis. This representation includes 54% of the total variance. The numbering corresponds to the one of Fig. 4. Both olfactory bulbs (left and right) of animals 1 (amylacetate), 7 (isovaleric acid) and 12 (pure air) were analyzed. They are represented as 1R, 7R and 12R for the right bulbs and 1L, 7L and 12L for the left ones. The single bulb to be analyzed in animals 4 (amylacetate), 6 (isovaleric acid) and 10 (pure air) has been sampled twice during two different measurement sessions. The resulting OD profiles are represented as 4 and 4', 6 and 6', 10 and 10' respectively. The first factor separates the two odor-stimulated groups. The second and third ones separate the animals which received pure air from those which were odor-stimulated. The analysis do not segregate the left and right profiles nor the successive measurements of the same bulb.

(4, 6, 10 vs 4', 6', 10'). These observations demonstrate that the animals were segregated according to the stimulus they were submitted to and, as a consequence, that the 2-DG glomerular patterns are well correlated with the quality of the stimulus. Moreover, the reliability of the method is illustrated by the grouping of the successive measurements of the same bulbs while the symmetry of the 2-DG patterning can be inferred from the grouping of left and right measurements in the same animal. This last observation confirms that the choice of the left or right bulb for image analysis was not crucial.

Identification of areas highly correlated with selective olfactory stimulations

In order to identify graphically the position of the variables which were the most concerned with the segregation of the two odor-stimulated groups, we have first represented the variables in their own factorial space defined by the first and second axis (Fig. 6). Afterwards, we have delimited on the first axis a

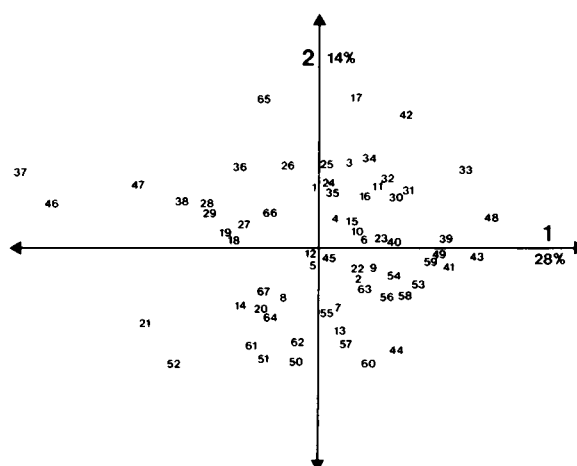


Fig. 6. Representation of the variables in the factorial space defined by factors 1 and 2. The two farthest variables (37 and 48) were used for limiting a segment on the horizontal axis (first factor). This segment was divided into 10 classes which were ranked from 0 to 9 for one odor and from 9 to 0 for the other. By this way, each variable was given a rank value taking in account its position along the axis representing the first factor. These values were used for building the maps shown in Fig. 7.

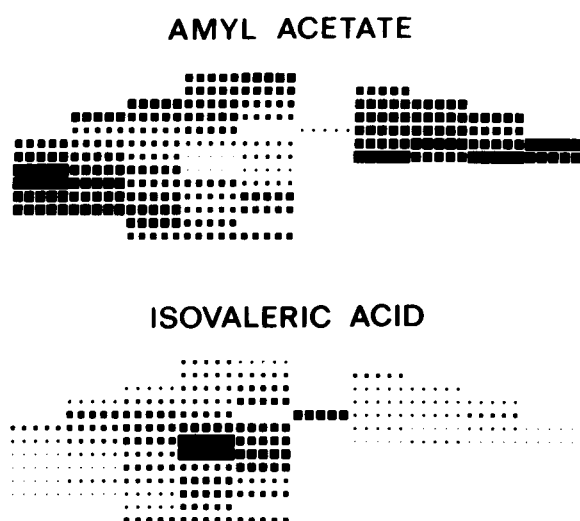


Fig. 7. Theoretical maps representing the respective weight of the variables in the variance supported by the first factor. Each variable has been positioned into a theoretical matrix and replaced by a square the size of which was proportional to the value established as shown in Fig. 6. When compared with the true spread-out representations of the glomerular labelling (Fig. 4), these theoretical maps show that the most-labelled glomerular areas were determinant in the cluster segregation by the first factor. Reciprocally, these maps display the most discriminative features of the patterns of glomerular activation typical of each odor.

segment whose limits corresponded to the two farthest variables. Then, the segment was divided into 10 classes which were ranked from 0 to 9 from one odor and from 9 to 0 for the other. As a consequence, the factorial space was divided into 10 sectors and every variable was attributed a number corresponding to the rank of the class it belongs to. Finally, every variable was positioned in a theoretical spread-out bulbar representation and symbolized by a square whose side was proportional to its rank value (Fig. 7). The glomerular coordinates which are displayed by this way can be considered as the most typical of the corresponding odors and could constitute the main features of the specific patterns of glomerular activation.

DISCUSSION

Validation of the method

Computer-assisted analysis of 2-DG autoradiograms has progressed over the last years with the aid

of densitometric probes^{5,12,25} or video cameras^{8,20} as image acquisition systems. We have found it advantageous to use a sophisticated video-based device with preprogrammed routines controlling important set-up operations such as OD calibration or shading correction. Moreover, the software control of operating functions proved very useful for managing the sampling procedure. Indeed, the sampling methodology was decisive in so far as our purpose was to estimate the labelling of the glomerular layer as a whole by analyzing a limited number of sections. The sampling interval that we have selected (10 sections) could have caused a loss of information when a significantly labelled glomerulus fell outside the sampled sections. Furthermore, it might occur that highly labelled glomerular foci were shared in two parts by two consecutive measurement frames, resulting in a local underestimation of optical density. However, it is likely that such occurrences did not invalidate the method since the shape of the bulbar OD profiles remained unchanged.

The semi-quantitative analysis of 2-DG autoradiograms has been a widely used^{1,2,4,9,12,16,17,19,22,23} and sometimes criticized¹³ application of the 2-DG method. This simplified analytic procedure was achieved in order to detect local alterations of functional activity without measuring the absolute rates of glucose utilization. Most authors used OD ratios as indices of metabolic activity. Each OD value measured in the brain area to be evaluated was divided by a reference OD value taken at the level of a structure not concerned by the experimental protocol. This reference value could be considered as an index of global metabolic activity and the use of OD ratios has been validated provided that the film background was subtracted from OD measurements, that the films were not approaching saturation¹⁷ and that there was no substantial difference in the overall darkness of the images obtained with different animals⁴. Furthermore, other kinds of normalizations were tested in order to improve their utilization as ordinal indices of metabolic activity⁴. In the framework of our study, the use of OD ratios proved unnecessary since our purpose was to compare OD profiles with reference to the coordinates of the loci of relatively high 2-DG uptake. In a preliminary approach, we had performed a principal component analysis using the absolute OD profiles. In such con-

ditions, the first factor supported 77% of the total variance and was clearly related to the weight of the individual profiles. Considering one OD profile, the weight involved odor-related features (mainly the number of highly labelled glomeruli) and unspecific ones as well (global 2-DG incorporation in the brain in relation with uncontrolled metabolic parameters). For making relevant comparisons, we found it adequate to standardize OD profiles which equalized their mean levels but did not change their shape. In other words, the distribution of the peaks of intense labelling was considered as more significant than their absolute amplitude. One must remember in this connection that the labelling of the autoradiograms resulted from an accumulation process which lasted for 45 min whereas the discrimination of an olfactory stimulus could be done within a few fractions of a second. In other words, it is unlikely that the absolute values of 2-DG labelling represent a relevant parameter in terms of olfactory information processing. On the other hand, the topological characteristics of patterns of glomerular activation are certainly determinant in olfactory coding^{7,10,11}.

With reference to its principles, the principal component analysis was well adapted to the statistical comparison of OD profiles. Indeed, we could verify that the segregation of 3 clusters corresponding to the experimental groups was actually related to the spatial features of the most labelled glomerular areas. Finally, we could built up synthetical maps which displayed the most representative features of the pattern specificity (Fig. 7). This type of representation did not illustrate the actual activation patterns, since it excluded the possibility of patterns overlapping. However, building such representations for a range of different compounds might be of great interest for a better understanding of spatial dimension in olfactory coding. The efficiency of the method in the case of stimuli giving rise to largely overlapping patterns remains to be demonstrated. The current limits to the method power are due to the uncompleted superimposition of the spread-out surface reconstructions of the glomerular layer. Controlling the sectioning plane of olfactory bulbs in the Cryostat according to stereotaxic coordinates might improve this stage of the procedure and prevent the resulting loss of data that occurred in our experimental conditions.

Effect of pure air delivery

One should wonder at the heterogeneous glomerular labelling in the animals stimulated with pure air. In fact, authors have already observed such an unexpected labelling^{9,23,26} which could be due to several factors: first, it proved impossible to remove all the odors from the exposure cage. Secondly, it is likely that the metabolic state of the different glomeruli was not equivalent at the beginning of the experiment. Indeed, the most important features that must be kept in mind are the unambiguous separation of the control animals by the principal component analysis and the lack of specific glomerular patterning in this group. This confirms that the specific patterns that we described following olfactory stimulations resulted from the selective activation of the olfactory system by the odorant compound.

Specificity and reliability of glomerular patterns

The 2-DG method has proven very useful for understanding some features of the spatial dimension in olfactory coding. For example, it gave rise to the unexpected observation that the olfactory glomerulus behaves like a functional unit^{9,15}. As a consequence, the population of glomeruli highly activated following olfactory stimulation occurs in a spatial pattern whose characteristics were generally considered as odor-specific^{9,10,23,26}.

The results of the present study demonstrate that the patterns of glomerular activation are actually odor-specific. The obvious segregation of clusters which correspond to the experimental groups can be interpreted as a demonstration of the pattern specificity. Each odor induced a significant glomerular activation within a particular bulbar area. Moreover, the spatial localization of the glomeruli tuned for a pure odorant compound looked very similar from one individual to another. It is likely that those glomeruli represent a preferential target for the receptors activated by the stimulus. Owing to the topographical organization of the projections of receptors onto the bulb^{3,21}, the glomerular patterns could illustrate a spatially organized distribution of the receptor sensitivity in the olfactory epithelium. The topographical organization of neuronal responses in the olfactory system and its probable function in olfactory coding have been already emphasized^{7,11}. However, the method that we propose in this study provides

a better accuracy in the analysis and should offer the possibility of comparing large sets of patterns elicited by series of odors.

Isovaleric acid pattern

A particular attention must be paid to the limited number of glomeruli which displayed a high metabolic response to isovaleric acid stimulations. This restricted labelling might be correlated with the high detection threshold found in C57/BL6 mice for this compound³¹. However, the concentrations that we used in this study were largely above this threshold value. Furthermore, mice strains which were found to have a normal sensitivity for isovaleric acid displayed a similar restricted labelling (Sicard et al., unpublished observations). Indeed, the well-focused glomerular activation that follows isovaleric acid stimulation must be compared to those observed by authors following stimulations with biological signals²⁷. Since isovaleric acid might be involved in pheromonal communication in mammals¹⁸, original mechanisms of coding should be hypothesized for this kind of olfactory signals. Specific investigations

on this topic are now in progress (Sicard et al.) with the aid of the computer-assisted method that we have described in this report.

Further experiments are needed for a better understanding of the mechanism of olfactory coding. The 2-DG method still remains the best one for mapping the glomerular activity in response to olfactory stimulations. We hope that the computer-assisted method that we have developed in this study will contribute to the study of patterning in the bulbar response and, therefore, to the elucidation of questions concerning the spatial dimension in olfactory coding.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank Mr. C. Gauthier (Laboratoire de Biométrie, Université Cl. Bernard) for his contribution to data analysis and Pr. A. Holley for his critical reading of the manuscript. This work was supported by Grant 06931 from the ATP 'Supports moléculaires et cellulaires des codes sensoriels' of the Centre national de la Recherche scientifique.

REFERENCES

- 1 Astic, L. and Cattarelli, M., Metabolic mapping of functional activity in the rat olfactory system after a bilateral transection of the lateral olfactory tract, *Brain Research*, 245 (1982) 17–25.
- 2 Astic, L. and Saucier, D., Ontogenesis of the functional activity of rat olfactory bulb: autoradiographic study with the 2-deoxyglucose method, *Dev. Brain Res.*, 2 (1982) 243–256.
- 3 Astic, L. and Saucier, D., Anatomical mapping of the neuroepithelial projection to the olfactory bulb, *Brain Res. Bull.*, 16 (1986) 445–454.
- 4 Gallistel, C.R., Piner, C.T., Allen, T.O., Adler, N.T., Yadin, E. and Negin, M., Computer-assisted analysis of 2DG autoradiographs, *Neurosci. Biobehav. Rev.*, 6 (1982) 409–420.
- 5 Gooch, C., Rasband, W. and Sokoloff, M.D., Computerized densitometry and color coding of [¹⁴C]deoxyglucose autoradiographs, *Ann. Neurol.*, 7 (1980) 359–370.
- 6 Gower, J.C., Some distance properties of latent root and vector methods used in multivariate analysis, *Biometrika*, 53 (1966) 325–338.
- 7 Holley, A. and Døving, K.B., Receptor sensitivity, acceptor distribution, convergence and neural coding in the olfactory system. In J. le Magnen and P. MacLeod (Eds.), *Olfaction and Taste*, Vol. VI, IRL, London, 1977, pp. 113–123.
- 8 Isseroff, A. and Lancet, D., An inexpensive microcomputer-based image-analysis system: novel applications to quantitative autoradiography, *J. Neurosci. Methods*, 12 (1985) 265–275.
- 9 Jourdan, F., Duveau, A., Astic, L. and Holley, A., Spatial distribution of [¹⁴C]deoxyglucose uptake in the olfactory bulbs of rats stimulated with two different odours, *Brain Research*, 188 (1980) 139–154.
- 10 Jourdan, F., Spatial dimension in olfactory coding: a representation of the 2-deoxyglucose patterns of glomerular labeling in the olfactory bulb, *Brain Research*, 240 (1982) 341–344.
- 11 Kauer, J.S., Some spatial characteristics of central information processing in the vertebrate olfactory pathway. In H. Van Der Starre (Ed.), *Olfaction and Taste*, Vol. VII, IRL, London, 1980, pp. 227–236.
- 12 Kauer, J.S., Reddy, D., Duckrow, R.B. and Shepherd, G.M., A simplified method for computerized densitometry of complex shapes in 2-deoxyglucose autoradiographs, *J. Neurosci.*, 11 (1984) 143–158.
- 13 Kelly, P.A. and MacCullough, J., A critical appraisal of semi-quantitative analysis of 2-deoxyglucose autoradiographs, *Brain Research*, 269 (1983) 165–167.
- 14 Kennedy, C., Des Rosiers, M.H., Jehle, M.M., Reivich, M., Sharp, F.R. and Sokoloff, L., Mapping of functional neural pathways by autoradiographic survey of local metabolic rate with [¹⁴C]deoxyglucose, *Science*, 187 (1975) 850–853.
- 15 Lancet, D., Greer, C.A., Kauer, J.S. and Shepherd, G., Mapping of odor-related neuronal activity in the olfactory bulbs by high-resolution 2-deoxyglucose autoradiography, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 79 (1982) 670–674.

- 16 Meibach, R.C., Glick, S.D., Ross, D.A., Cox, R.D. and Maayani, S., Intraperitoneal administration and other modifications of the 2-deoxyglucose technique, *Brain Research*, 195 (1980) 167–176.
- 17 Mitchell, I.J. and Crossman, A.R., In defence of optical density ratios in 2-deoxyglucose autoradiography, *Brain Research*, 298 (1984) 191–192.
- 18 Muller-Schwarze, D., Muller-Schwarze, C., Singer, A.G. and Silverstein, R.M., Mammalian pheromone: identification of active component in the subauricular scent of the male pronghorn, *Science*, 183 (1974) 860–862.
- 19 Orsini, J.C., Jourdan, F., Cooper, H.M. and Monmaur, P., Influence of female odors on lateral hypothalamus in the male rat. Semiquantitative deoxyglucose analysis, *Physiol. Behav.*, 35 (1985) 509–516.
- 20 Porro, C., Fonda, S., Baraldi, P., Biral, G.P. and Cavazzuti, M., Computer-assisted analyses of [^{14}C] 2-DG autoradiographs employing a general purpose image processing system, *J. Neurosci. Methods*, 11 (1984) 243–250.
- 21 Saucier, D. and Astic, L., Analysis of the topographical organization of the olfactory epithelium projections in the rat, *Brain Res. Bull.*, 16 (1986) 455–462.
- 22 Sharp, F.R., Kilduff, T.S., Bzorgchami, S., Heller, H.C. and Ryan, A.F., The relationship of local cerebral glucose utilization to optical density ratios, *Brain Research*, 263 (1983) 97–103.
- 23 Skeen, L.C., Odor-induced patterns of 2-deoxyglucose consumption in the olfactory bulb of the tree shrew, *Tupaia glis*, *Brain Research*, 124 (1977) 147–153.
- 24 Sokoloff, L., Reivich, M., Kennedy, C., Des Rosiers, M.M., Patlak, C.S., Pettigrew, K.D., Sakurada, O. and Shinihara, M., The ^{14}C -deoxyglucose method for the measurement of local cerebral utilization: theory, procedure and mammal values in the conscious and anaesthetized albino rat, *J. Neurochem.*, 28 (1977) 897–916.
- 25 Stein, A., Juliano, S., Karp, P. and Hand, P., Computer-assisted three-dimensional and two-dimensional reconstructions of autoradiographic images of the cerebral cortex, *J. Neurosci. Methods*, 10 (1984) 189–198.
- 26 Stewart, W.B., Kauer, J.S. and Shepherd, G.M., Functional organization of rat olfactory bulb analysed by the 2-deoxyglucose method, *J. Comp. Neurol.*, 185 (1979) 715–734.
- 27 Teicher, M.H., Stewart, W.B., Kauer, J.S. and Shepherd, G.M., Suckling pheromone stimulation of a modified glomerular region in the developing rat olfactory bulb revealed by the 2-deoxyglucose method, *Brain Research*, 194 (1980) 530–535.
- 28 Vigouroux, M. and Royet, J.P., An olfactometric cage suitable for short duration stimulations of unrestrained small animals, *J. Neurosci. Methods*, 4 (1984) 849–851.
- 29 Weibel, E.R., *Stereological Methods*, Vol. 1, Academic, London, 1979.
- 30 Weibel, E.R., *Stereological Methods*, Vol. 2, Academic, London, 1980.
- 31 Wysocki, C.J., Withney, G. and Tucker, D., Specific anosmia in the laboratory mouse, *Behav. Genet.*, 7 (1977) 171–188.

BRE 14298

A comparative study of 2-deoxyglucose patterns of glomerular activation in the olfactory bulbs of C57 BL/6J and AKR/J mice

Gilles Sicard, Jean-Pierre Royet and Francois Jourdan

Laboratoire de Physiologie Neurosensorielle, CNRS, Université Claude Bernard, Villeurbanne, Cedex (France)

(Accepted 9 August 1988)

Key words: Specific anosmia; Isovaleric acid; Olfactory glomerular layer; AKR/J mouse; C57BL/6J mouse

We have studied the patterns of glomerular activation evoked in the olfactory bulbs of C57BL/6J and AKR/J mice by olfactory stimulations with amyl acetate or isovaleric acid. Patterns of glomerular activation were obtained with the 2-deoxyglucose method and subsequently compared using a computer-assisted image analysis. The mice of both inbred strains stimulated with amyl acetate or isovaleric acid were characterized by areas of high 2-deoxyglucose uptake in their glomerular layer. Statistical comparisons of the patterns demonstrated that they were odor-specific. Although C57BL/6J mice have been found to be specifically anosmic to isovaleric acid, our findings indicate that their olfactory system is topographically activated by olfactory stimulations with this odorant. However, patterns of glomerular activity evoked by isovaleric acid stimulations are not similar in the two studied strains.

INTRODUCTION

Specific anosmia has been described for the first time in human subjects^{17,18}. This olfactory deficit is characterized by the difficulty some subjects encounter when detecting a particular odor while these subjects show an otherwise normal olfactory sensitivity^{1,3,5,7,27,27}. Wysocki and his co-workers⁴¹ have probably evidenced a similar phenomenon in animals by testing the olfactory abilities of several mouse strains. Using an aversion conditioning paradigm, they intended to compare the olfactory sensitivity of several strains to isovaleric acid and amyl acetate. They concluded that AKR/J and C57BL/6J mice showed a similar olfactory sensitivity to amyl acetate, that AKR/J mice could be considered as normosmic for isovaleric acid and that C57BL/6J mice presented a relative hyposmia to this compound. Ever since, other specific anosmias have been investigated in various mouse strains^{29,43}.

Assuming a peripheral origin of the deficit, one may suppose that a selective decrease of olfactory sensitivity could be due to a gene-dependent impairment of some receptor cells usually activated by a

stimulus^{2,4,7,9,39,42}. It has been demonstrated that different olfactory stimuli elicit responses from partly distinct subsets of receptor cells^{14,30,34}. They also evoke different patterns of glomerular activation in olfactory bulbs, as shown by the 2-deoxyglucose (2-DG) method^{10,20,21,32,35–37}. Hence, a contingent modification of the receptive properties of neuroreceptor cells sensitive to isovaleric acid in C57BL/6J mice could lead to an alteration of the patterns of glomerular activation evoked by this compound. In the present work, we have tested this hypothesis by comparing the 2-DG patterns evoked either by amyl acetate or isovaleric acid in AKR/J and C57BL/6J mice. We used a previously reported procedure³² based on computer-assisted image analysis and statistical comparison of patterns obtained with the non-quantitative 2-DG method²².

MATERIALS AND METHODS

Subjects

The experiments were carried out on 20 male AKR/J mice available from CSEAL, Orléans, France, and 20 male C57BL/6J mice available from

Correspondence: G. Sicard, Laboratoire de Physiologie Neurosensorielle, Université Claude Bernard, 69622 Villeurbanne, Cedex, France.

IFFA-CREDO, St. Germain L'Arbresle, France. Animals were housed in groups with food and water *ad libitum*. During a one-week period, each animal was placed daily in the stimulation device for a 30 min familiarization course. The animals were then submitted to the experimental procedure. They were 7–9 weeks old at this time.

Experimental procedure

The olfactory stimulations were delivered to animals freely moving on an iron grid plate placed in a cylindrical plexiglas chamber (20 cm in diameter and 30 cm high). The chamber was permanently rinsed by a laminar flow of purified air (10 liters/min) which was flowing down from the lid of the apparatus and evacuated at its opened bottom. The odorants were stored in glass flasks and adequate stimulus concentrations were obtained by dilution of the odorant vapors with a diverted part of the pure air stream. The temperature of the air stream was kept at 25 °C. The odorants were reagent grade chemicals obtained from Fluka and Merck. Isovaleric acid was delivered at a mean concentration of either $3.5 \cdot 10^{-6}$ M or $1.0 \cdot 10^{-7}$ M. Amyl acetate was delivered at a mean concentration of either $6.5 \cdot 10^{-6}$ M or $1.9 \cdot 10^{-7}$ M. Eight experimental groups (two odorants \times two concentrations \times two inbred strains) and two additional control groups (pure air \times two inbred strains), including 4 animals each, were formed.

Each animal was first placed in the stimulation device for 30 min while pure air was flowing down in the cage. Then, it received an i.p. injection of [14 C]2-DG (CEA, France) in a sterile saline solution (200 μ Ci/kg, 0.2 ml) and was immediately put back into the stimulation device for a 45-min period. During this period, the control animals were exposed to a constant pure air flow whereas the experimental animals were submitted to alternate odorized and pure air flows, in successive phases lasting 5 min each. At the end of the stimulation period the animals were decapitated and their olfactory bulbs were removed and quickly frozen by immersion in isopentane at -50 °C. The bulbs were cut in coronal serial sections (20 μ m thick), at -17 °C in a motorized cryostat. The sections were picked up on 60 °C warmed glass slides and put in close contact with radiographic films (Kodak, DEF 5) into Kodak

X-ray cassettes. After a 7-day exposure at 4 °C, the sections were stained with Cresyl violet and the autoradiographic films were classically processed.

Optical density measurements

The uptake of 2-DG by the glomerular layer was estimated by direct measurements of optical density (OD) of the autoradiograms. The procedure has been previously described³². In order to determine the measurement areas and collect the OD values we used a microscope, a video digitizer and a computer-assisted image analyser (Quantimet 900, Cambridge Instruments). Each pixel of the digitized images corresponded to a 6 μ m-sided square. The OD measurements were carried out after introducing a shading correction and an OD calibration.

Images of the section and of the autoradiogram (Fig. 1) were superimposed on the video screen. Thus, we were able to delineate accurately the measurement areas corresponding to the glomerular layer on each autoradiogram. A measurement live frame, 120 μ m height, was then automatically displaced along the delineated glomerular area. Optical density measurements were done in the intersections of this frame with the glomerular area. As a consequence, the glomerular layer of each analyzed section was represented by a set of OD values. Thirteen sections per bulb, regularly spaced along the rostro-caudal axis of the bulb, were analyzed. The complete glomerular layer from each olfactory bulb was thus represented by 13 series of OD values which could be arranged to show spread-out representation of the glomerular layer (Fig. 2a,b) or aligned to form an OD profile suitable for statistical analysis (Fig. 2c).

Standardization of optical density values

In this comparative study, we focused on spatial aspect of the glomerular activation. In order to compare activation patterns from several animals, the relative values of 2-DG uptake only were taken into account. The OD profiles were standardized into normalized Z-scores (Xs) according to the following formula:

$$X_s = (X_o - \bar{X})/\sigma$$

in which \bar{X} is the subject OD mean, σ is the standard

deviation and X_o is the absolute OD value.

This transformation equalized the absolute levels of OD profiles but did not affect their shapes.

Unfolded representations of the glomerular layer

In each section, the relative positions of the OD measurements were localized in the lateral and medial aspects with respect to their distances from

the dorsal pole of the glomerular layer. A two-dimensional representation of the glomerular layer was obtained by (1) the alignment of the poles along a rostro-caudal axis and (2) the spreading out of medial and lateral data on both sides of this axis (Fig. 2a). In order to improve the visual estimation of 2-DG patterns, graphic maps were built up by replacing the numerical values by squares of relative sizes (Fig. 2b).

Data analysis

We compared the patterns of glomerular activation obtained in the different experimental conditions by using two complementary methods: (1) a

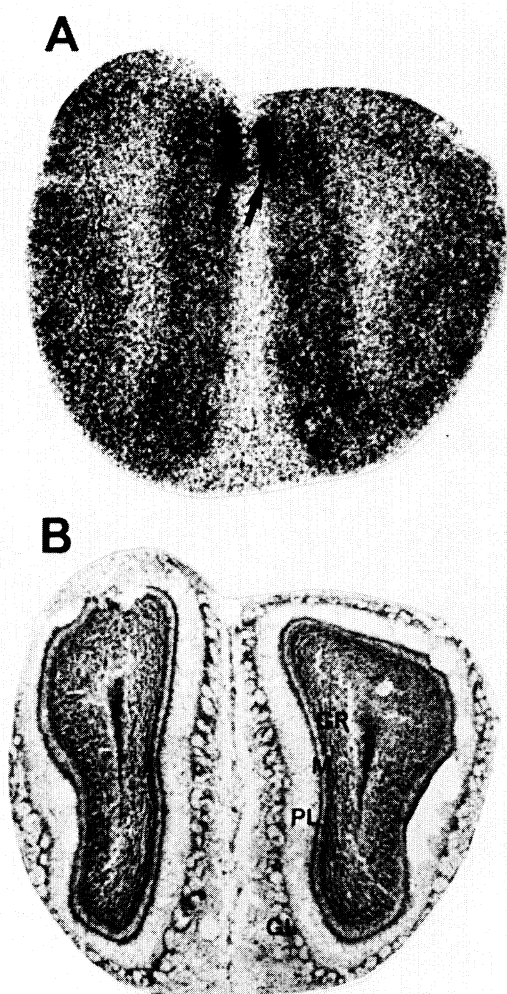


Fig. 1. An autoradiograph and the corresponding coronal section of olfactory bulbs from C57BL/6 mice. A: autoradiograph showing symmetrical foci of high 2-DG uptake (arrows) evoked by olfactory stimulation with isovaleric acid. This intense labeling is located in medio-dorsal areas of the glomerular layer. Homologous foci were identified in AKR mice and rats stimulated with same odorant. B: cresyl violet-stained sections of the olfactory bulbs: GL, glomerular layer; PL, external plexiform layer; M, mitral cell layer; GR, granular cell layer.

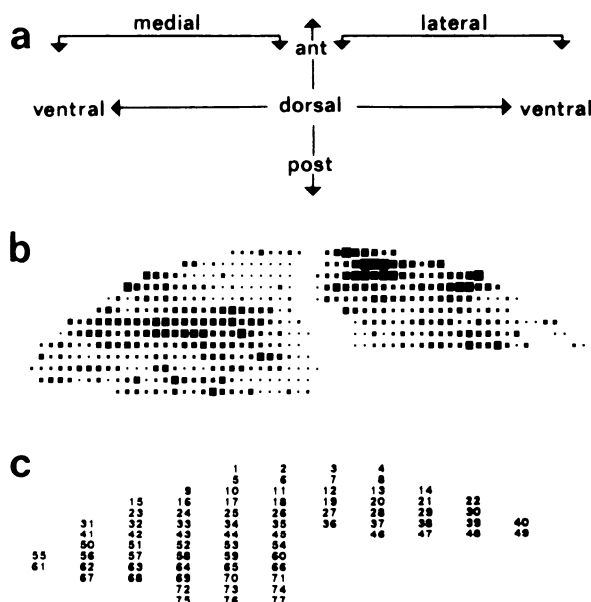


Fig. 2. a: orientation of the spread-out reconstructions of the glomerular layer of the olfactory bulb of the mice. In order to limit spatial distortion of the map, the median side of the sections and the dorsal poles of the glomerular layer served as geometrical references during image processing. Spread-out reconstructions were obtained by an alignment of the data corresponding to the dorsal poles of the sections along a rostro-caudal axis. b: an example of an original unfolded representation of the glomerular layer. Each row of the dot matrix corresponds to one analyzed section. Each dot corresponds to one measurement. The graphic representation was obtained after grouping of the standardized OD values in classes. Optical density value classes were replaced by squares of relative sizes. The most labeled areas are represented by the largest squares. c: identification and localization of the 77 variables which have been used in statistical comparisons of the OD density profiles.

principal component analysis was used to describe the relationships between individual glomerular OD profiles, (2) a hierarchical clustering analysis based on the calculation of the classical euclidean distances between observations, and on the optimization of the variances within clusters^{8,31} was used to test the consistency of the grouping of the glomerular profiles.

Each studied olfactory bulb provided a set of about 500 standardized OD values. As a rule, each 5 contiguous measurements were averaged and each bulb was represented by an OD vector profile. All the 40 OD profiles, each corresponding to an individual, were arranged into a data matrix. In a few cases, due to some irregularity of the sections, the whole glomerular layer could not be entirely identified. When data were missing in one individual OD profile, the corresponding columns of the data matrix were withdrawn from the subsequent calculations. In spite of these constraints, the data matrix to be processed was made of 40 individual OD profiles of 77 values each (Fig. 2c) and more than 80% of the original data were retained. The related dispersion matrix was used to perform the principal component analysis.

RESULTS

Unfolded representations of 2-DG uptake in the glomerular layer

As demonstrated in a prior study³², olfactory stimulations of C57BL/6 mice with high concentrations of isovaleric acid or amyl acetate give rise to different patterns of glomerular activation. Unfolded representations of 2-DG uptake in the glomerular layer (Fig. 3A,B) show that the patterns induced by isovaleric acid stimulations are the most manifest owing to a restricted highly labeled area located in the medio-dorsal region of the bulb.

In AKR mice stimulated with the same compound at the same concentration (Fig. 3A), intense labeling is found in the same area but appear as more scattered. The patterns of 2-DG uptake evoked by olfactory stimulations with the lower concentration of isovaleric acid prove more difficult to delineate than those corresponding to the stronger stimulation, particularly in AKR mice (Fig. 3C,D). However, the foci of 2-DG uptake, when present, lie in

areas involved in the 2-DG patterns obtained with higher concentrations of the stimulus.

In both strains stimulated with amyl acetate, the patterns of 2-DG uptake are much more widely distributed (Fig. 4). However, the medio-ventral glomerular area appears as the most frequently activated.

Unfolded representations of glomerular patterns in mice submitted to pure air (Fig. 5) display major interindividual variations. The occurrence of glomerular areas of relatively high uptake in control groups has been already described and discussed^{20,32,37} and does not question the validity of studies showing specific 2-DG patterns of glomerular activation.

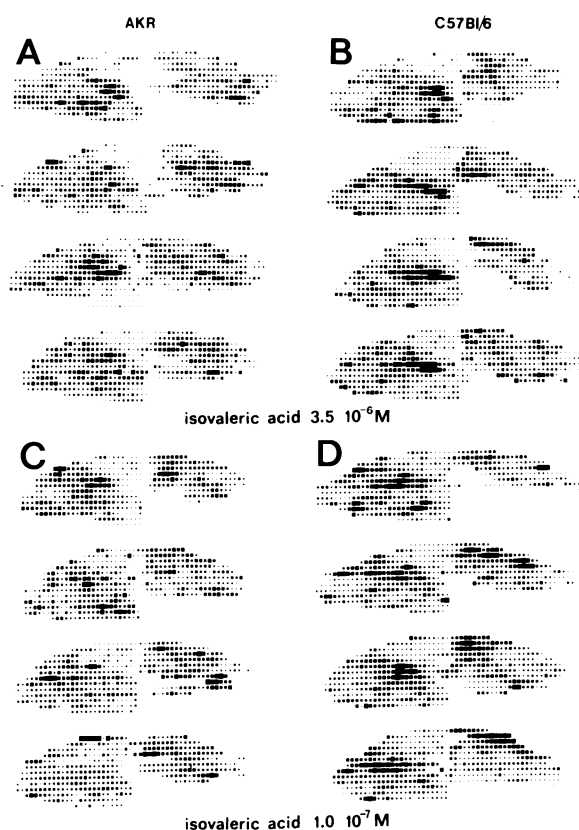


Fig. 3. Spread-out reconstructions of the glomerular 2-DG patterns of mice AKR/J and C57BL/6J exposed to isovaleric acid at $3.5 \cdot 10^{-6}$ M (A,B) or $1.0 \cdot 10^{-7}$ M (C,D) during a 45-min period.

Statistical comparison of the patterns of 2-DG glomerular uptake

In a preliminary comparison of the individual 2-DG patterns, we have submitted the whole set of OD profiles to a principal component analysis. The first 3 components accounted for 31% of the total variance only. The OD profiles were distributed in the factorial space according to the nature of olfactory stimuli rather than some strain specificity. The profiles corresponding to pure air exposures were sparsely distributed. To evaluate the consistency of the profile grouping, we have submitted the set of OD profiles to a hierarchical cluster analysis. The dendrogram obtained by this procedure is depicted in Fig. 6. Taking the increase of the cluster dispersion into account, the set can be reasonably partitioned into 3 clusters. The cluster C1 is almost exclusively made of amyl acetate-induced profiles from both strains and contains two control samples.

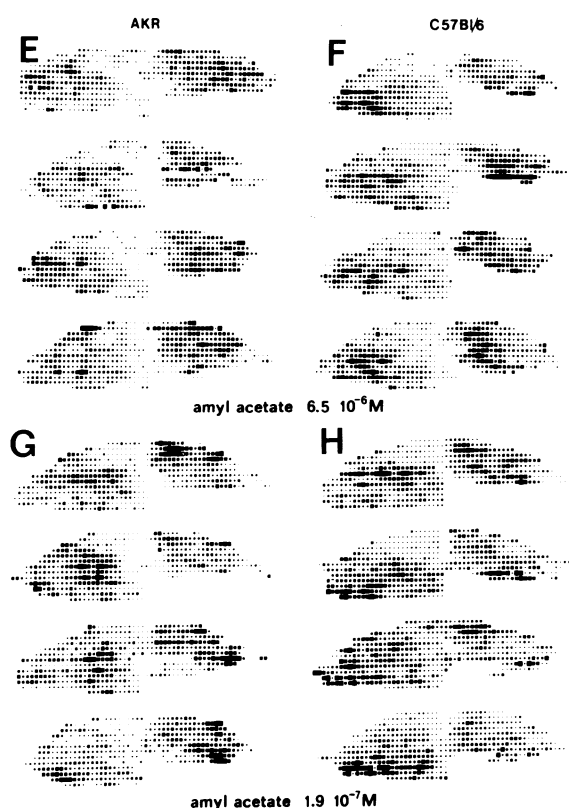


Fig. 4. Spread-out reconstructions of the glomerular 2-DG patterns of mice AKR/J and C57BL/6J exposed to amyl acetate at $6.5 \cdot 10^{-6}$ M (E,F) or $1.9 \cdot 10^{-7}$ M (G,H) during a 45-min period.

Another cluster, C2, contains 7 out of the 8 profiles elicited by isovaleric acid in C57BL/6 mice, two profiles induced by isovaleric acid in AKR mice and two profiles induced by low concentration of amyl acetate in AKR or C57BL/6 mice. The last one, C3, is composed of control profiles as well as remaining odorant-elicited ones, including 6/8 profiles elicited by isovaleric acid in AKR mice. It must be emphasized that the AKR and C57BL/6 profiles evoked by isovaleric acid are clearly segregated. Focusing on the concentration effect, the partitions of the OD profiles related to both levels of stimulation are not found strictly similar. We found it useful to carry on the analysis of clusters by considering separately the OD profiles obtained with high and low concentrations of olfactory stimuli. Thus, hierarchical cluster analyses were performed on two subsets including 16 profiles each and corresponding to the experimental groups defined with respect to the stimulus intensity. The resulting dendrograms are depicted in Fig. 7. After strong stimulations (Fig. 7a), the OD profiles evoked by isovaleric acid and those evoked by amyl acetate in both strains are found to be distributed in separate clusters. Furthermore, the four C57BL/6-isovaleric acid profiles are segregated from 3 of the AKR-isovaleric acid profiles out of 4. As they are clustered together, the amyl acetate profiles evoked in the two strains prove to be far more similar.

The interpretation of the dendrogram obtained from the analysis of the data corresponding to the low stimulations (Fig. 7b) is all the more difficult as the existence of separate clusters seems more questionable. However, 3 clusters roughly analogous to those identified in the dendrogram (a) can be distinguished. The miss-classification of some individuals in the dendrogram (b) indicates that the differences between the odor-induced profiles tend to become indistinct at the lower concentrations.

DISCUSSION

Odor-specific glomerular 2-DG patterns

Most studies of 2-DG uptake in the olfactory bulbs have shown that different odors evoked different patterns of 2-DG labeling in the glomerular layer^{20,35,37}. The actual specificity of 2-DG patterns has been recently confirmed³² with the aid of computer-assisted image analysis and statistical tests.

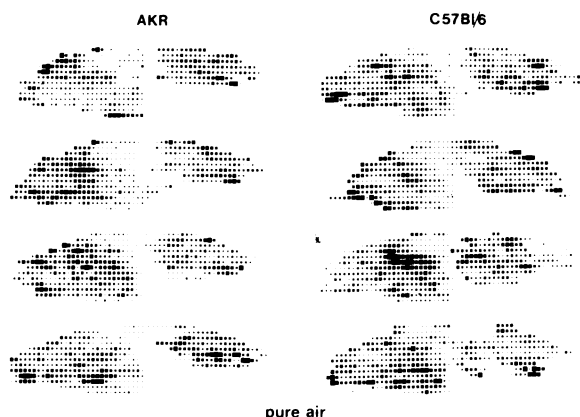


Fig. 5. Spread-out reconstructions of the glomerular 2-DG patterns of mice AKR/J and C57BL/6J exposed to pure air flow during a 45-min period.

In the present work based on the same approach, we observed once again an obvious segregation of amyl acetate and isovaleric acid patterns. In addition, we have tested two concentrations of the stimulus. This allowed us to verify that a decrease in stimulus intensity altered the extent of the glomerular 2-DG patterns as already reported by Stewart et al.³⁷. However, our observations do not question the existence of selective patterns following stimulations at low concentrations.

Comparing the two strains, we have found that patterns evoked by amyl acetate were roughly similar, widely distributed in the glomerular layer. The localization of the most labeled areas is consistent with previous observations made in the rat with the same odor³⁷. As a consequence, it could be assumed that some characteristic features of odor-specific patterns of glomerular activation might be shared by different rodent species.

This hypothesis is also supported by preliminary observations of isovaleric acid-evoked 2-DG patterns in the rat (unpublished observations): in this species we found the most intense foci of 2-DG uptake in the medio-dorsal area which corresponds to the glomerular region mostly activated by isovaleric acid stimulations in both mouse strains (Fig. 1). In addition, homologous discrete foci have been described in rats stimulated with an other short-chained fatty acid, namely propionic acid³⁶.

In terms of olfactory chemotopology, it can be postulated that the heterogeneous spatial distribu-

tion of the chemosensitivity in the olfactory epithelium^{12,25,38} and the topographical organization of the epithelium-to-bulb projections^{6,11,26} display common features among several rodent species. Further comparative studies are now needed to substantiate this suggestion.

Peripheral sensitivity to isovaleric acid in C57BL/6 mice

One important finding reported here is the occurrence of conspicuous patterns of high 2-DG uptake evoked in the glomerular of C57BL/6 mice by isovaleric acid stimulations delivered at both high and low concentrations. The specificity of these patterns seems to be indisputable considering both their repetition and the homology of some labelings observed in the two strains. Since it has been demonstrated that focal 2-DG uptake in the glomerular layer results from peripheral activation of primary axons¹⁶, we can infer that interactions between the olfactory stimulus and some receptor cells did occur in isovaleric acid-stimulated C57BL/6 mice.

Wysocki et al.⁴¹ have demonstrated that these mice detect unambiguously an aversive aqueous solution of 10^{-2} M isovaleric acid and fail to avoid the solution at 10^{-4} M. Assuming a complete deficit of the olfactory sensitivity to isovaleric acid in this strain, they called for the participation of gustatory, trigeminal or vomeronasal nervous pathways to explain the behavioral responses to highly concentrated stimulations. Contradictorily, our findings indicate that the periphery of the olfactory system of these animals is sensitive to isovaleric acid. This conclusion needs several comments.

First, if C57BL/6 mice are really anosmic to isovaleric acid, their deficit might be related to more central impairments of the olfactory system.

Alternatively, the olfactory deficit to isovaleric acid found in C57BL/6 could be partial²³ and explained by peripheral impairments of the olfactory system^{1,2,7,17,18,23,41}. The deficit could be better described as a selective hyposmia and a part only of the olfactory properties of the molecule might be detected by the olfactory system of these animals. Studies on specific anosmia in human subjects have demonstrated that qualitative defects can be associated with increased thresholds of olfactory detection

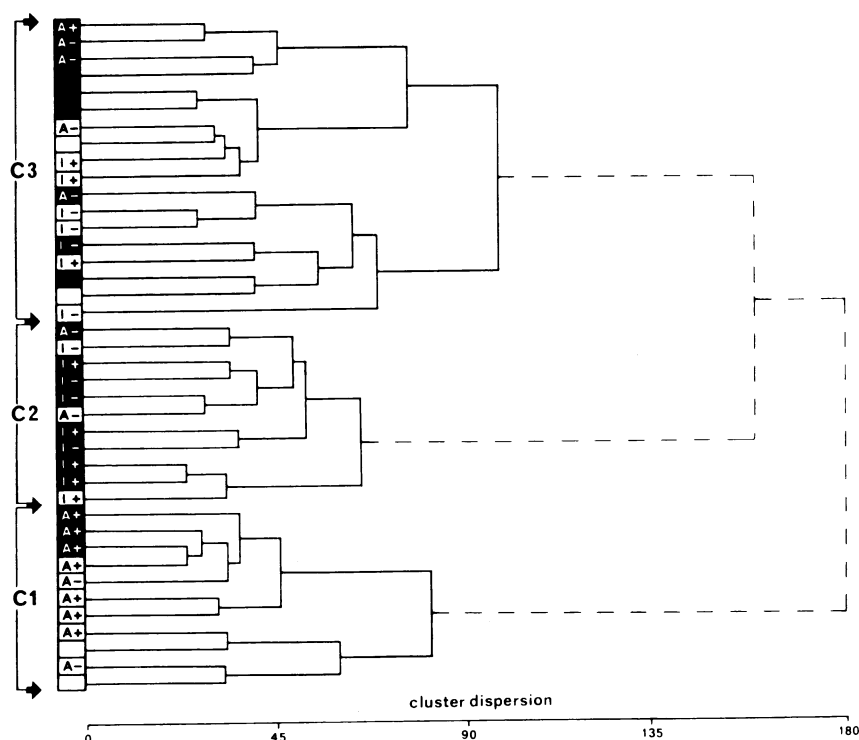


Fig. 6. Cluster dendrogram for the hierarchical cluster analysis of the whole set of glomerular OD profiles. The levels of this taxonomy describe the inter-cluster variance (cluster dispersion) which is read along the abscissa. Mouse strains: open cells, AKR/J mice; filled cells, C57BL/6J mice. Olfactory stimulations: I+, $3.5 \cdot 10^{-6}$ M isovaleric acid; I-, $1.0 \cdot 10^{-7}$ M isovaleric acid; A+, $6.5 \cdot 10^{-6}$ M amyl acetate; A-, $1.9 \cdot 10^{-7}$ M amyl acetate. Pure air: unlabeled cells.

for a restricted set of chemicals^{3-5,18}. Due to the limits of the method, the present study did not allow us to estimate directly differences of detection thresholds between members of the two studied strains. Nevertheless we have emphasized that the glomerular responses to isovaleric acid stimulations were not quite similar in the two strains. The well-delineated labeling in the medio-dorsal area in C57BL/6 mice differs appreciably from the more diffused labeling observed in the same glomerular region of the AKR mice. These anatomo-functional differences might indicate that the receptive properties of the sensory cells are not strictly identical in the two strains. In principle, this could result from the lack of membrane receptors depending on genetic controls. This hypothesis has been proposed to explain the phenomenon of specific anosmia observed in human subjects^{1-5,27,28} and is supported by studies of inheritance of specific anosmia in human families which have suggested a genetic dependence of these failures of the smell^{9,39,42}.

Furthermore, the data about the selectivity of olfactory receptor cells are consistent with the assumption that each odorant may interact with several types of receptor sites^{7,13,15,19,33,34}. According to the present results, only part of those receptors sensitive to isovaleric acid could be altered or absent in C57BL/6 mice since their glomerular layer is obviously activated following olfactory stimulation with this compound. Even though one type of membrane receptor playing a major role in the detection of isovaleric acid at low concentrations is missing in C57BL/6 mice, stronger stimulations could activate receptor neurons characterized by responses with a higher threshold and mediated by less sensitive types of membrane receptors. Consequently, strong stimulations with isovaleric acid could give rise to glomerular activation and, consecutively, to positive behavioral responses even in deficient animals.

In conclusion, we have found a conspicuous glomerular activation following stimulations by iso-

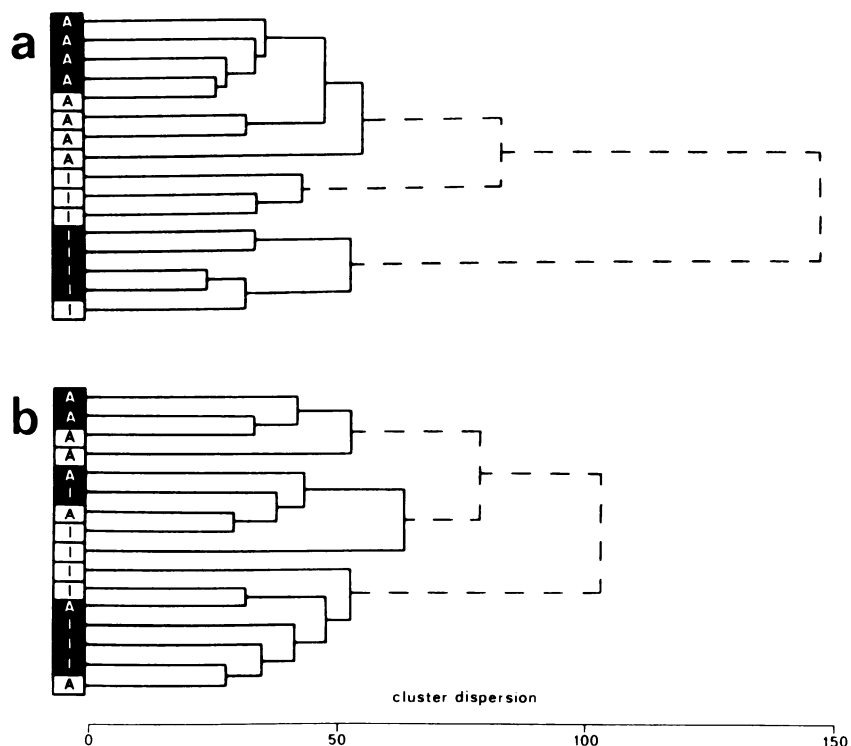


Fig. 7. Separate cluster analyses of two subsets of data defined with respect to the stimulus concentrations. Dendrogram (a) corresponds to the 16 animals exposed to the highest concentrations, dendrogram (b) corresponds to the 16 animals exposed to the lowest concentrations. Cluster dispersion is read along the abscissa. Mouse strains: AKR/J, opened cells; C57BL/6J, filled cells. Olfactory stimulations: I, isovaleric acid. A, amyl acetate.

valeric acid in mice which are reputed to be specifically anosmic to this compound. In accordance with the results of behavioral investigations, this observation suggests that these mice can detect the olfactory stimulus delivered at high concentration. However, qualitative alterations of the olfactory perception of isovaleric acid in C57BL/6 mice can be expected since we have observed modified patterns of glomerular activation evoked by this compound. Such alterations were actually described in some cases of specific anosmia described in human subjects^{4,5,18}. Hence, the present findings might reinforce the common idea that specific anosmia depends on a deficiency of specific membrane receptors^{2,7,18,24,42}. However, the findings reported here cannot argue definitively against the hypothesis that specific anosmia could also be mediated by more central impairments of the olfactory system. As it was observed in other mouse strains^{40,44},

genetic variations can affect the synaptic organization in the olfactory bulbs. Such impairments might explain disorders of the olfactory abilities but have not been yet investigated in C57BL/6 mice. Thus, this hypothesis deserves further experimental supports to be maintained.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors wish to thank Dr. A. Holley for helpful discussion and critical reading of the manuscript. The Research reported here was supported by Grant 06931 from the ATP 'Supports moléculaires et cellulaires des codes sensoriels' of the Centre National de la Recherche Scientifique. Computer-assisted image analysis was performed at the Centre commun de Quantimétrie de l'Université Claude Bernard, Lyon I (Dir C. Souchier).

REFERENCES

- 1 Amoore, J.E., Specific anosmia: a clue to the olfactory code, *Nature (Lond.)*, 214 (1967) 1095–1098.
- 2 Amoore, J.E., Olfactory genetics and anosmia. In L.M. Beidler (Ed.), *Handbook of Sensory Physiology*, Vol IV/1, Springer, Berlin, 1971, pp. 245–256.
- 3 Amoore, J.E., Venstrom, D. and Nutting, M.D., Sweaty odor in fatty acids: measurement of similarity, confusion and fatigue, *J. Food Sci.*, 37 (1972) 33–35.
- 4 Amoore, J.E., Synthetic flavours: a new approach to efficiency and safety, *Chem. Senses*, 2 (1975) 27–38.
- 5 Amoore, J.E., Pelosi, P. and Forrester, L.J., Specific anosmia to 5 α -androst-16-en-3-one and Ω -pentadecalactone: the urinous and musky primary odors, *Chem. Senses*, 2 (1977) 401–425.
- 6 Astic, L. and Saucier, D., Anatomical mapping of the neuroepithelial projection to the olfactory bulb in the rat, *Brain Res. Bull.*, 16 (1986) 445–454.
- 7 Beets, M.G.J., Olfactory response and molecular structure. In L.M. Beidler (Ed.), *Handbook of Sensory Physiology*, Vol. IV/1, Springer, Berlin, 1971, pp. 257–322.
- 8 Benzecri, J.P., Construction ascendante d'une classification hiérarchique, *L'Analyse des Données*, Vol. 1, Dunod, Paris, 1973, pp. 153–206.
- 9 Brown, K.S. and Robinette, R.R., No simple pattern of inheritance inability to smell solutions of cyanide, *Nature (Lond.)*, 215 (1967) 406–408.
- 10 Coopersmith, R., Henderson, S. and Leon, M., Odor specificity of the enhanced neural response following early odor experience in the rats, *Dev. Brain Res.*, 21 (1986) 191–197.
- 11 Costanzo, R.M. and O'Connell, R.J., Spatially organized projections of hamster olfactory nerves, *Brain Research*, 139 (1978) 327–332.
- 12 Daval, G., Leveteau, J. and MacLeod, P., Analyse topographique de l'électro-olfactogramme chez la grenouille, *J. Physiol. (Paris)*, 62 (1980) 477–488.
- 13 Dodd, G.H. and Persaud, K., Biochemical mechanisms in vertebrate primary olfactory neurons. In R. Cagan and M. Kare (Eds.), *Biochemistry of Taste and Olfaction*, Academic, London, 1980, pp. 333–357.
- 14 Duchamp, A., Revial, M.F., Holley, A. and MacLeod, P., Odor discrimination by frog olfactory receptors, *Chem. Senses*, 1 (1974) 213–233.
- 15 Getchell, T.V. and Gesteland, R.C., The chemistry of olfactory reception: stimulus specific protection from sulfhydryl reagent inhibition, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 69 (1972) 1494–1498.
- 16 Greer, C.A., Stewart, W.B., Kauer, J.S. and Shepherd, G.M., Topological and laminar localization of 2-deoxyglucose uptake in the rat olfactory bulb induced by electrical stimulation of olfactory nerves, *Brain Research*, 217 (1981) 279–293.
- 17 Guillot, M., Anosmie partielle et odeurs fondamentales, *C.R. Acad. Sci. Paris*, 226 (1948) 1307–1309.
- 18 Guillot, M., Sur quelques caractères des phénomènes d'anosmie partielle, *C.R. Soc. Biol. Paris*, 142 (1948) 161–162.
- 19 Holley, A. and Doving, K.B., Receptor sensitivity, acceptor distribution, convergence and neural coding in the olfactory system. In Le Magnen J. and P. MacLeod (Eds.), *Olfaction and Taste VI*, IRL, London, 1977, pp. 113–123.
- 20 Jourdan, F., Duveau, A., Astic, L. and Holley, A., Spatial distribution of [14 C]2-deoxyglucose uptake in the olfactory bulbs of rats stimulated with two different odours, *Brain Research*, 188 (1980) 139–154.
- 21 Jourdan, F., Spatial dimension in olfactory coding: a representation of 2-deoxyglucose patterns of glomerular labelling in the olfactory bulb, *Brain Research*, 240 (1982) 341–344.
- 22 Kennedy, C., Des Rosiers, M.H., Jehle, J.W., Reivich, Sharp, M.F. and Sokoloff, R., Mapping of functional neural pathways by autoradiographic survey of local metabolic rate with [14 C]deoxyglucose, *Science*, 187 (1975) 850–853.
- 23 Labows, J.N. and Wysocki, C.J., Individual differences in odor perception, *Perfum. Flavorist*, 9 (1984) 21–26.
- 24 Lancet, D., Vertebrate olfactory reception, *Annu. Rev. Neurosci.*, 9 (1986) 329–355.
- 25 Mackay-Sim, A., Shaman, P. and Moulton, D.G., Topographic coding of olfactory quality: odorant specific patterns of epithelial responsivity in the salamander, *J. Neurophysiol.*, 48 (1982) 584–596.
- 26 Pedersen, P.E., Jatreboff, P.J., Stewart, W.B. and Shepherd, G.M., Mapping of olfactory receptor population that projects to a specific region in the rat olfactory bulb, *J. Comp. Neurol.*, 250 (1986) 93–108.
- 27 Pelosi, P. and Viti, R., Specific anosmia to 1-carvone: the minty primary odour, *Chem. Senses*, 3 (1978) 331–337.
- 28 Pelosi, P. and Pisanelli, A.M., Specific anosmia to 1-8 cineole: the camphor primary odor, *Chem. Senses*, 6 (1981) 87–93.
- 29 Price, S., Specific anosmia to geraniol in mice, *Neurosci. Lett.*, 4 (1977) 49–50.
- 30 Revial, M.F., Duchamp, A., Holley, A. and MacLeod, P., Frog olfaction: odour groups, acceptor distribution and receptor categories, *Chem. Senses*, 3 (1978) 23–33.
- 31 Roux, M., *Algorithmes de Classification*, Masson, Paris, 1985.
- 32 Royet, J.P., Sicard, G., Souchier, C. and Jourdan, J., Specificity of spatial patterns of glomerular activation in the mouse olfactory bulb: computer-assisted image analysis of 2-DG autoradiograms, *Brain Research*, 417 (1987) 1–11.
- 33 Shirley, S.G., Polak, E.H., Mather, R.A. and Dodd, G.H., The effect of concanavalin A on the rat electro-olfactogram. Differential inhibition of odorant response, *Biochem. J.*, 245 (1987) 175–184.
- 34 Sicard, G. and Holley, A., Receptor cell responses to odorants: similarities and differences among odorants, *Brain Research*, 292 (1984) 283–296.
- 35 Skeen, L.G., Odor induced patterns of 2-deoxyglucose consumption in the three shrew *Tupaia glis*, *Brain Research*, 124 (1977) 145–153.
- 36 Slotnick, B.M., Graham, S., Laing, D.G. and Bell, G.A., Detection of propionic acid vapor by rats with lesions of olfactory areas associated with high 2-DG uptake, *Brain Research*, 417 (1987) 343–346.
- 37 Stewart, W.B., Kauer, J.S. and Shepherd, G.M., Functional organization of rat olfactory bulb analyzed by the 2-deoxyglucose method, *J. Comp. Neurol.*, 185 (1979) 715–734.
- 38 Thommesen, G. and Doving, K.B., Spatial distribution of EOG in the rat: a variation with odour quality, *Acta Physiol. Scand.*, 99 (1977) 270–280.
- 39 Whissell-Buechy, D. and Amoore, J.E., Odor blindness to musk: simple recessive inheritance, *Nature (Lond.)*, 242 (1973) 271–273.

- 40 White, E.L., Synaptic organization of the mammalian olfactory glomerulus: new findings including intraspecific variations, *Brain Research*, 60 (1973) 299–313.
- 41 Wysocki, C.J., Whitney, G. and Tucker, D., Specific anosmia in the laboratory mouse, *Behav. Genet.*, 7 (1977) 171–188.
- 42 Wysocki, C.J. and Beauchamp, G.K., Ability to smell androsterone is genetically determined, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 81 (1984) 4899–4902.
- 43 Wysocki, C.J., Genotypic variation in mammalian odor perception phenotypes that may provide insight into olfactory transduction, *Chem. Senses*, 10 (1985) 389.
- 44 Wyss, J.M., Stanfield, B.B. and Cowan, W.M., Structural abnormalities in the olfactory bulb of the Reeler mouse, *Brain Research*, 188 (1980) 566–571.

Des représentations de l'espace olfactif: des récepteurs à la perception
Sicard, G. Chastrette, M., Godinot, N.
Intellectica, 1997, 24:85-107

L'odeur, notion polysémique qui recouvre stimulus et perception, résiste à une description en terme de traits, de caractéristiques, ou dimensions. On a reconnu, cependant, l'existence dans le génome du rat d'une grande variété de gènes de récepteurs aux odeurs, probablement plusieurs centaines (Buck et Axel, 1991). Puis, on a trouvé d'autres représentants de cette large famille chez plusieurs espèces, y compris chez l'homme, le poisson chat ou l'abeille (Ben Arie et al., 1994, Ngai et al., 1993, Danty et al., 1994). Les protéines codées par ces gènes présentent des analogies de structure avec d'autres récepteurs comme ceux impliqués dans la neuromédiation, par exemple, et qui sont bien connus du point de vue pharmacologique. Un récepteur donné reconnaît spécifiquement un nombre limité de substances, agonistes ou antagonistes, naturelles ou synthétiques. Un même signal moléculaire peut interagir avec plusieurs espèces de récepteurs, comme l'acétyl-choline agit avec des récepteurs muscariniques et des récepteurs nicotiniques par exemple.

Dans le système olfactif, on sait chiffrer la variété des espèces de récepteurs, mais on ne connaît pas encore leurs spécificités. C'est pourtant bien là que commence la possibilité d'une représentation nerveuse des odeurs.

Certains envisagent que la connaissance des spécificités des récepteurs des odeurs, c'est à dire, en définitive, la possibilité de représenter l'odeur par la liste, éventuellement pondérée, des récepteurs avec lesquels l'odeur-stimulus interagit, donnerait les clés d'un code de l'odeur-perception. Nous pensons qu'au moins deux types de difficultés peuvent s'opposer à la simplicité de cette idée. D'une part, la possibilité de liens fonctionnels entre plusieurs récepteurs, (synergies ou antagonismes), de tels liens pouvant être établis à n'importe quel niveau du traitement de l'information olfactive, en particulier dès le niveau périphérique. D'autre part, chacun admettra que, sans connaître les propriétés de la cible du signal affiché à l'entrée d'un système de traitement, il est difficile de prévoir ce qui en sera retenu ou, pour ce qui nous concerne, ce qui serait finalement signifiant pour un individu dans la représentation de l'odeur formée par ses récepteurs.

Cependant, à la sortie du système, on accède aux produits perceptifs lorsque l'individu exprime comportementalement ou verbalement ce qu'il ressent, qu'il communique le sens qu'il accorde à ses sensations. On prétend alors extraire certains traits des stimuli olfactifs. De la confrontation des «représentations» obtenues à deux niveaux du traitement nous tirons également des enseignements sur les opérations ou fonctions de traitement réalisées entre les deux niveaux.

L'histoire de la recherche de coïncidences entre une représentation nerveuse périphérique de l'odeur, une représentation chimique et la perception de l'odeur que nous rapportons ici, rapproche les points de vue de physiologistes et de chimistes.

Avant d'examiner à propos d'un exemple particulier, les rapports entre ces représentations de l'odeur, nous rappelons quelques données fondamentales sur l'organisation du système nerveux olfactif.

Le système olfactif: éléments d'organisation

C'est dans la cavité nasale que le système reçoit directement les signaux chimiques de l'environnement. Les neurones de la muqueuse olfactive, qui portent les récepteurs des odeurs et sont sensibles aux stimuli chimiques, sont disposés dans un épithélium largement étalé. Ces

neurones récepteurs transmettent leur message aux neurones de second ordre. Ceux-ci ont leurs corps cellulaires situés dans un organe nerveux dédié, le bulbe olfactif, à l'intérieur de la boîte crânienne. Le premier relais synaptique, où l'échange d'information entre les neurones récepteurs et les neurones de second ordre a lieu, se trouve dans des structures individualisées du bulbe olfactif nommées glomérules olfactifs. Plusieurs millions de neurones récepteurs convergent vers quelques dizaines de milliers de neurones de second ordre au travers de quelques milliers de glomérules. Ces neurones bulbaires, d'une part, sont inscrits dans des réseaux de neurones locaux qui participent à la "mise en forme" du message olfactif. Ils sont, d'autre part, sous l'influence d'un contrôle central provenant des territoires directement innervés par les neurones secondaires mais aussi de régions plus lointaines, du tronc cérébral ou du télencéphale basal. Le bulbe olfactif est organisé en couches histologiques concentriques, si bien qu'on peut considérer en première approximation que la projection des neurones récepteurs se répartit dans un espace à deux dimensions.

Comparativement à d'autres appareils sensoriels, la chaîne neuronale qu'empruntent les messages olfactifs pour atteindre un cortex est courte puisque les seconds neurones projettent directement sur un cortex primaire, s'étendant sur le cortex piriforme et le cortex entorhinal à la partie inférieure des lobes temporaux du cerveau. Au delà des bulbes olfactifs l'information olfactive est très largement distribuée (Figure 1).

Les neurones récepteurs sont fonctionnellement isolés les uns des autres, et constituent des canaux d'information indépendants. Si on est capable de recueillir la réponse des neurones récepteurs aux stimulations chimiques, on accède à la représentation périphérique de l'odeur telle qu'elle est transmise aux réseaux neuronaux bulbaires. La muqueuse olfactive ressemble fort à un organe passif qui enregistre dans l'environnement les propriétés que permettent de détecter les récepteurs qui le composent.

Chez certaines espèces au moins, les différents récepteurs se répartissent à l'intérieur de territoires limités et variés de la surface de la muqueuse olfactive (Nef et al., 1992, Strotmann et al., 1992, Ressler et al., 1993). Cela se traduit, à l'échelle macroscopique, par l'hétérogénéité spatiale des sensibilités à différents odorants (Mackay-Sim et al., 1982, Edwards et al., 1988), une chimiotopie qui est d'ailleurs reproductible d'un individu à l'autre. Dans la plupart des cas, une stimulation odorante évoque cependant une réponse sur l'ensemble du territoire récepteur olfactif (Youngentob et Kent, 1995), ce qu'on peut interpréter comme le fait qu'un odorant, même pur, interagit généralement avec plusieurs espèces de récepteurs.

L'analyse des données récentes recueillies chez le mammifère indique comment l'information discriminante liée aux propriétés des récepteurs pourrait être conservée à l'étage bulbaire. Tout d'abord, on suppose qu'un neurone récepteur ne porte qu'un seul type de récepteur (Buck et Axel, 1991, Chess et al., 1993, Leibovici et al., 1996). Grâce à une projection ordonnée (Astic et al., 1986) et probablement amplifiante (Viret-Duchamp et al., 1989), les neurones porteurs d'un même récepteur, éparpillés dans la muqueuse, se rejoignent sur un petit groupe de glomérules olfactifs, voire un seul (Ressler et al., 1994, Vassar et al., 1994), convergence qui compacte l'information. L'activation bulbaire présente, comme la périphérie, des motifs d'activation spatialement identifiables à l'échelle glomérulaire (Stewart et al., 1979, Jourdan et al., 1980, Sicard et al., 1989) ou à l'échelle cellulaire (Mori et al., 1992). A partir de là, l'existence d'interactions neuronales transversales à la progression de l'information olfactive, le fonctionnement unitaire du glomérule (Buonviso et Chaput, 1990), et les capacités intrinsèques du système à discriminer les motifs spatiaux d'activation imposés par des stimulations électriques localisées du bulbe olfactif (Mouly et Holley, 1985),

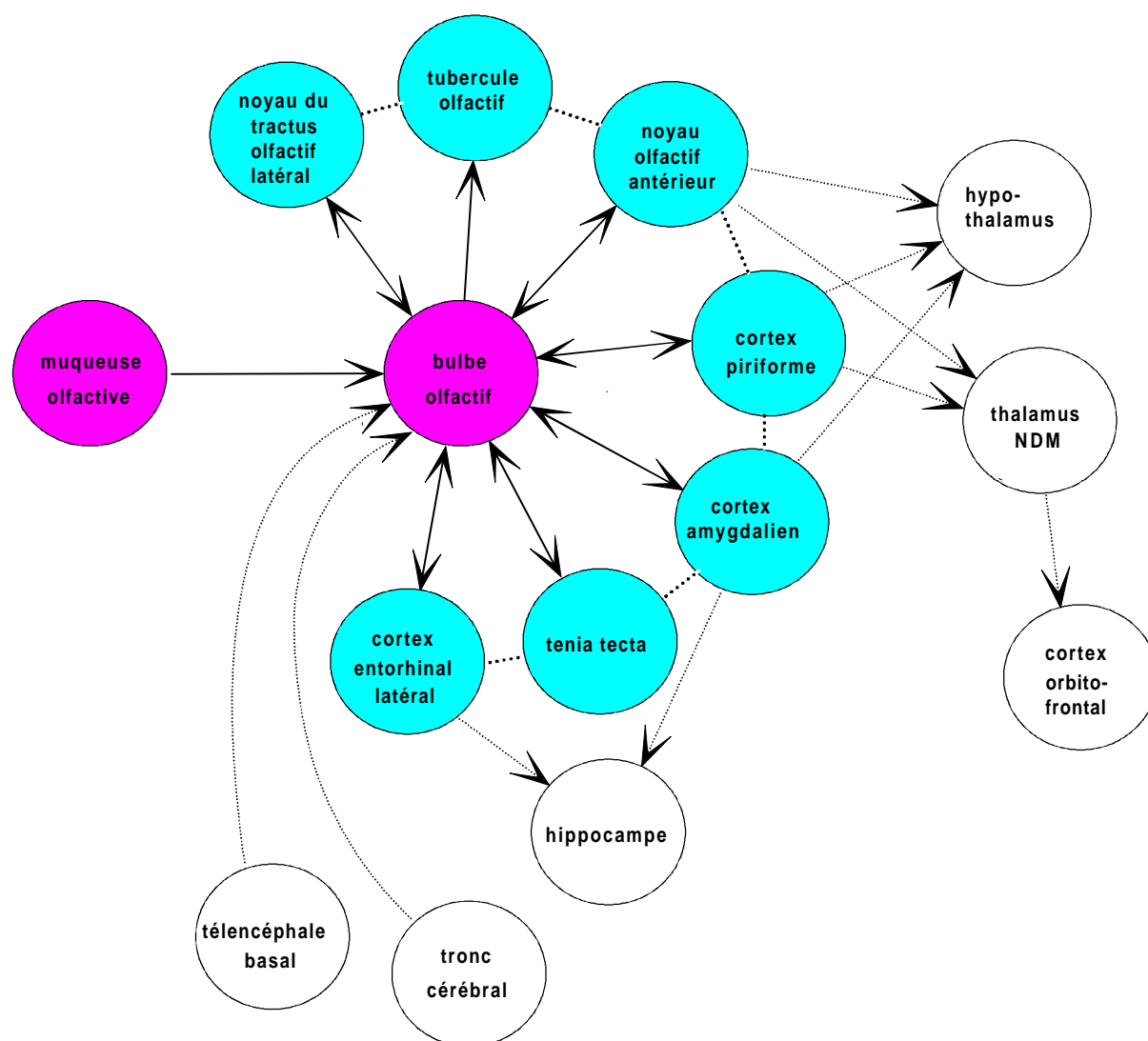


Figure 1: Projections centrales des messages bulbaires olfactifs et modulations d'origine centrale de l'activité du bulbe olfactif. Au delà des bulbes olfactifs, les informations olfactives sont transmises à de multiples structures. Les neurones secondaires innervent ainsi le cortex piriforme et le cortex entorhinal, le noyau olfactif antérieur, le tubercule olfactif, et le cortex périamygdalien. Un réseau de connexions associatives relie ces différents territoires corticaux olfactifs primaires. Depuis ces aires primaires, d'autres neurones transmettent l'information olfactive vers des aires fonctionnellement variées, non spécifiquement olfactives, corticales et sous-corticales, comme, par exemple, l'hippocampe, l'hypothalamus ou le thalamus. Depuis le thalamus, des projections se dirigent vers le cortex frontal. Les voies nerveuses olfactives sont pratiquement directes, la narine droite projette ses fibres olfactives sur le cerveau droit, la gauche sur le cerveau gauche. On a cependant noté que la stimulation olfactive entraîne préférentiellement l'activation du cortex orbito-frontal droit (Zatorre et al., 1992). Les territoires corticaux olfactifs primaires projettent leurs rétroactions sur le bulbe olfactif. Des influences extrinsèques (éveil, attention) s'y exercent aussi.

tendent à installer l'idée qu'un motif topographique représente un code de l'odeur, c'est à dire que les caractéristiques topographiques de l'activation bulbaire sont retenues par les étages supérieurs, privilège d'une représentation-tableau.

Cette conception est loin de combler le physiologiste. Tout d'abord, cette description ne dit rien de la dimension temporelle du message olfactif. Par ailleurs, on sait que la lésion partielle des bulbes olfactifs, donc l'atteinte du motif d'activation bulbaire, n'entraîne pas la disparition totale des capacités de reconnaissance d'une odeur (Hudson et Distel, 1986). Cela

nous laisse penser que l'image d'une odeur au niveau bulbaire peut être suffisamment distribuée, redondante ou divisée pour que la préservation d'une partie seulement de la représentation bulbaire permette au système de reconstituer le sens du tout. On peut ajouter que des arguments neurochimiques, prenant en compte la distribution inégale des rétroactions d'origine centrale (Greer et al., 1982, Zheng, et al., 1987, Lejeune, et al., 1995) démontrent que toute l'aire bulbaire n'est pas, elle-même, fonctionnellement homogène. Enfin, au delà du bulbe olfactif, l'image que nous avons du message nerveux nous apparaît moins nette, et nous ne tenterons pas, ici, de la décrire plus avant! Nous notons, malgré tout, qu'on s'attend à ce que les différentes aires de projection, si variées sur le plan anatomo-fonctionnel, ne recueillent chacune qu'une partie, probablement pertinemment sélectionnée, de l'information transmise par les bulbes olfactifs (Holley, 1991).

Formation d'une représentation de l'odeur dans l'organe récepteur des odeurs.

Que dit le nez de la grenouille au cerveau de la grenouille? Dès qu'il fut possible de recueillir les réponses des neurones récepteurs olfactifs aux stimulations olfactives, on s'aperçut que chaque cellule était sensible à un grand nombre de molécules odorantes (Gesteland et al., 1963). Toutes les cellules réceptrices ne répondaient pas aux mêmes espèces moléculaires, et on comprenait cette diversité des profils de sensibilité comme la condition nécessaire à la réalisation de la fonction de discrimination du système olfactif (Figure 2). Il faut noter que ces conclusions sont le fruit d'observations réalisées essentiellement sur quelques amphibiens et que jusqu'ici les données recueillies chez les mammifères sont rares

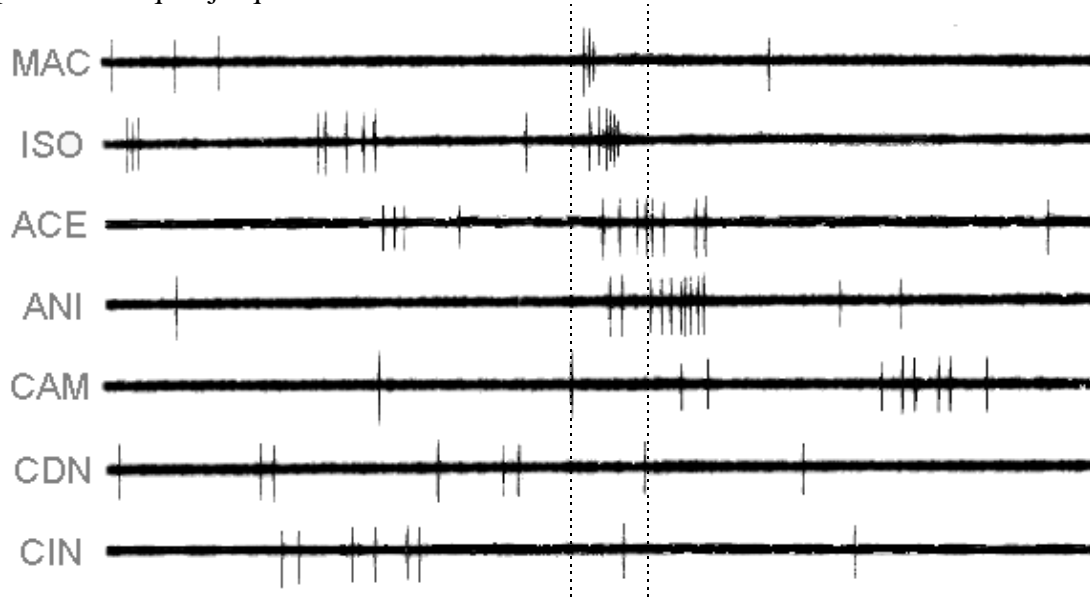


Figure 2 Exemple de profil de sensibilité d'une cellule olfactive vis à vis d'un ensemble de stimuli odorants. Des stimulations gazeuses odorisées de deux secondes ont été délivrées dans l'intervalle limité sur la figure par les deux lignes pointillées. Sept odorants ont été testés: La méthyl amyle cétone (MAC), l'acétate d'iso-amyle (ISO), l'acétophénone (ACE), l'anisole (ANI), le camphre (CAM), la cyclodécane (CDN) et le cinéole (CIN). La cellule enregistrée émet des potentiels d'action sporadiques en l'absence de stimulation, et augmente leur fréquence d'émission lorsqu'elle est sensible à l'odorant. Elle répond fortement à la méthyl amyle cétone et à l'acétate d'iso-amyle, plus faiblement à l'acétophénone et à l'anisole, mais ne répond ni au camphre, ni au cinéole, ni à la cyclodécane.

(Gesteland et al., 1982, Maue et Dionne, 1987, Sicard, 1986, Hirono et al., 1994). Celles-ci cependant laissent penser que les organisations des couches réceptrices des amphibiens et des mammifères ne sont pas strictement identiques: Nous y reviendrons.

On cherchait cependant en vain, des similitudes chimiques entre les odorants qui évoquaient la réponse d'une même cellule. Pour expliquer ces premières observations, on supposa que la sélectivité dépendait de l'interaction des molécules odorantes avec des récepteurs portés par les cellules réceptrices et que, de plus, ces récepteurs des odeurs étaient peu spécifiques et/ou que chaque cellule portait une combinaison de récepteurs aux spécificités variées. L'étendue du répertoire des récepteurs différents était inconnue. Duchamp et al. (1974) imaginèrent qu'en disposant de multiples profils pour un nombre fini d'odorants, on pourrait calculer une distance entre les odorants, donc les représenter dans un espace qui, d'une part, serait une image des capacités de discrimination de l'organe récepteur des odeurs et, d'autre part, caractériserait le plus directement possible les interactions moléculaires entre odeurs et cellules réceptrices, et renseignerait donc sur les propriétés des récepteurs des odeurs eux-mêmes. A cause de la durée limitée des contacts que l'on pouvait établir avec les cellules réceptrices, on ne pouvait envisager de recueillir le profil de sensibilité de chaque cellule étudiée que pour une vingtaine d'odorants seulement. Pour explorer un domaine suffisamment représentatif de l'espace des molécules odorantes, on a dû multiplier les études indépendantes (Duchamp et al, 1974, Revial et al., 1978, Revial et al., 1982, 1983, Sicard, 1985). Au cours de cette suite d'études, 68 corps purs au total ont été choisis comme stimuli olfactifs pour répondre à des hypothèses sur les relations entre la structure chimique et l'odeur des espèces moléculaires. Nous ne rappelons ici que les résultats d'une de ces études (Sicard et Holley, 1984) qui a réuni les observations principales réalisées sur la grenouille grâce à une sélection des stimuli qui couvraient un large domaine d'odeurs et de structures chimiques (Table 1). Parce que commune aux trois études que nous décrivons ici, cette série de stimuli olfactifs nous a permis d'imaginer la confrontation des représentations physiologiques, chimiques et perceptives des odeurs.

Table 1: Liste des vingt corps purs utilisés aux cours des trois types d'approches

composés	abréviations	composés	abréviations
acétate d' <i>iso</i> -amyle	ISO	cyclohexanone	XON
acétophénone	ACE	<i>para</i> -cymène	CYM
acide <i>iso</i> -valérique	IVA	<i>n</i> -heptanol	HEP
anisole	ANI	<i>l</i> -menthol	MEN
<i>n</i> -butanol	BUT	méthyl amyle cétone	MAC
<i>dl</i> -camphre	CAM	<i>d</i> -limonène	LIM
<i>l</i> -8 cinéole	CIN	phénol	PHE
<i>d</i> -citronellol	DCI	pyridine	PYR
cyclodécانون	CDN	thiophénol	PHO
cyclohexanol	XOL	thymol	THY

Expériences et analyse de données

Le protocole d'enregistrement consistait à placer une micro-électrode au contact d'une cellule réceptrice de la muqueuse d'une grenouille décérébrée et déméduillée, et à recueillir sa réponse à une vingtaine de stimulations odorantes. Les vingt odorants étaient délivrés en phase gazeuse, à des concentrations prédéterminées (comprises entre la moitié et le vingtième de la concentration de la vapeur saturante) et constantes pour chaque cellule étudiée. Après avoir répété soixante fois cette opération, on disposait d'une matrice de réponses et de non-réponses dont nous nous sommes servi pour mesurer la similitude d'action des odorants testés sur les

cellules étudiées et calculer une distance entre les odorants. Nous avons choisi de représenter ces relations dans un espace factoriel construit à l'aide d'une analyse des correspondances (Benzecri, 1963). Les résultats d'une taxinomie non hiérarchique descendante ont été utilisés pour donner une information conservant la totalité de la variance sur le premier plan factoriel qui ne rend compte que de 33% de la variance totale (Figure 3). Dans cet espace on découvre que s'individualisent certains couples ou certains triplets d'odorants. Par contre, la représentation simultanée des cellules réceptrices, non montrée ici, indiquait qu'on ne pouvait pas raisonnablement considérer qu'il existait des groupes de cellules en regard des paires ou des groupes d'odorants.

Construction d'une représentation chimique de l'odeur.

Justification de la méthode

L'existence de relations entre la structure chimique des molécules et les perceptions olfactives qu'elles entraînent peut sembler surprenante, compte tenu de la complexité du traitement du signal originel chimique.

Cependant de telles relations ont été établies pour une douzaine de notes olfactives et plus de 1200 molécules différentes. Elles sont d'une qualité telle qu'elles permettent d'établir des modèles d'interaction et de prédire l'odeur de molécules non encore synthétisées. Cette approche est utilisée par les industriels de la parfumerie pour "inventer" de nouvelles molécules. On remarquera que ces relations n'ont pas l'ambition de couvrir une partie importante de l'espace olfactif. Elles sont au contraire limitées à la partie de cet espace qui s'étend autour d'une note bien déterminée comme musc, ambre, anis ou muguet.

La description de l'odeur repose sur l'emploi d'un vocabulaire spécialisé adopté par les parfumeurs, sans toutefois qu'il y ait un consensus total.

La description de la structure moléculaire peut se faire à deux niveaux selon qu'on considère la molécule dans son ensemble ou des fragments particuliers de la structure. Dans le premier cas les variables sont simples, peu nombreuses et facilement interprétables. Dans le second cas, elles peuvent être très nombreuses mais on préfère souvent aboutir à la définition d'un motif osmophore, porteur de l'odeur. Dans cet article, pour un jeu de molécules qui possèdent des structures bien différentes, il a paru suffisant d'utiliser des variables globales.

Plusieurs relations utilisant ce type de variables ont été publiées (Doving, 1974; Laffort et al., 1974) et l'une d'elles portait sur une série de vingt composés (Chastrette, 1981).

Dans cette publication les variables globales retenues étaient le volume molaire, la forme de la molécule définie à partir des axes de l'ellipsoïde dans lequel on peut l'inscrire, la réfraction molaire et une fonction de l'indice de réfraction, mesurant à elles deux la polarisabilité de la molécule, le logarithme du coefficient de partage octanol-eau et enfin les paramètres AN et DN de Gutman qui mesurent la capacité d'interaction par échange de paires d'électrons.

Ce travail a été étendu ensuite à d'autres séries étudiées sur la grenouille et en particulier à la série proposée dans cet article (Eminet, 1983).

La mise au point récente par Abraham (1993) de nouveaux paramètres a_H et b_H mesurant de manière satisfaisante la capacité d'une molécule à interagir par liaisons hydrogène nous a permis de remplacer AN et DN qui semblaient moins bien adaptés.

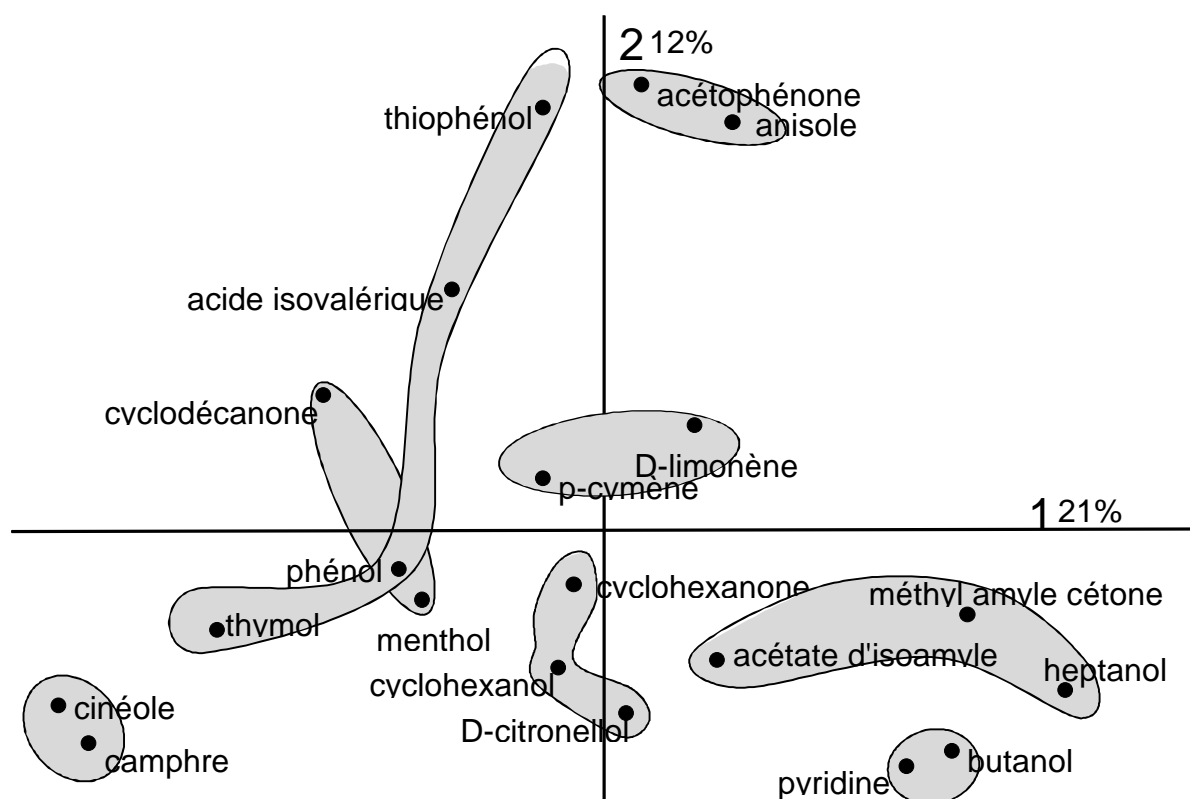


Figure 3: Etude des distances entre odorants telles qu'on peut les établir sur la base des réponses des neurones récepteurs olfactifs de la grenouille. Projection des odorants dans le premier plan factoriel d'une analyse factorielle des correspondances (Benzecri, 1963) et regroupements au huitième niveau d'une taxinomie non hiérarchique descendante (Emptoz et Fages, 1983). Le plan factoriel ne représente que 33% de la variance totale de la matrice de données.

En effet, nous avons proposé entre temps un modèle selon lequel l'interaction des odorants avec les protéines réceptrices est essentiellement due aux forces de dispersion et à la liaison hydrogène (Chastrette et Zakarya, 1988). C'est pourquoi nous avons choisi ici un ensemble de variables comprenant:

- le volume molaire (VM),
- une fonction de l'indice de réfraction n soit $RIF = n^2 - 1/(n^2 + 1)$
- la réfraction molaire $RM = RIF \times VM$
- le facteur de forme SF
- le logarithme du coefficient de partage octanol-eau LOP
- et les paramètres a_H et b_H d'Abraham.

Ces derniers ont été estimés à partir des composés les plus proches dans les quelques cas où ils n'étaient pas indiqués par Abraham.

Résultats

Ces variables ont été centrées et réduites avant d'opérer un classement automatique des odeurs. Nous avons utilisé ici aussi une classification automatique non hiérarchique et descendante (Emptoz et Fages, 1983). La figure 4, ci-dessous, indique les partitions obtenues pour les huit premiers niveaux taxinomiques, et permet de les comparer aux résultats obtenus selon la même procédure sur la matrice construite sur la base des réponses des neurones récepteurs.

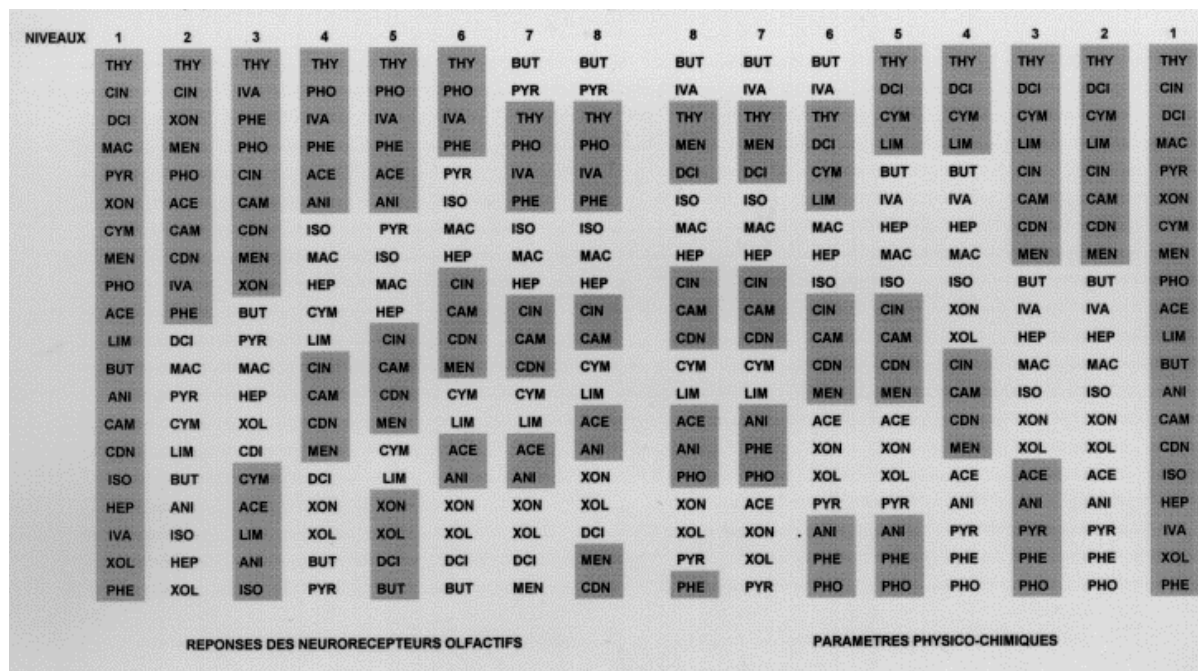


Figure 4: Taxinomies non hiérarchiques descendantes (Empoz et Fages, 1983) des odorants obtenues, à gauche, à la suite de l'interrogation des neurones récepteurs olfactifs de grenouille et, à droite, en représentant les substances odorantes à l'aide de variables globales physico-chimiques.

Cette comparaison, en particulier des 8^{èmes} niveaux, montre que les couples, cymène-limonène, acétophénone-anisole, et les triplets, cinéole, camphre et cyclodécane ou iso-amyle acétate, méthyl amyle cétone et heptanol, sont bien formés dans les deux espaces. Dans les deux cas, on note que le l-menthol ne se sépare du groupe cinéole, camphre, cyclodécane, qu'au niveau 7. Changeant de classes à plusieurs niveaux, le butanol et la pyridine semblent difficiles à classer dans l'espace des réponses des neurorécepteurs.

Représentation des odeurs à la suite d'une tâche de classification perceptive par des sujets humains.

Alors qu'on disposait de données sur la manière dont les récepteurs finalement traitaient vingt signaux identifiables chimiquement, nous ne disposions pas d'information sur leur perception par des sujets naïfs. Nous avons donc demandé à des sujets humains non entraînés de nous renseigner à la fois sur les distances qu'ils mettaient entre ces odorants et sur les évocations que la présentation de ces échantillons leur suggérait (Godinot et al., 1995). Une matrice de distances pouvait être obtenue par la comparaison une à une de toutes les paires possibles, ce qui entraînait à une expérience très longue puisqu'il fallait demander aux sujets d'examiner 190 paires d'odeurs. Nous lui avons préféré une tâche de tri ou de classification, procédure plus rapide dont Mac Rae et al. (1990) ont montré qu'elle conduisait à des résultats voisins

Après une série d'expériences préliminaires, nous avons dilué la plupart des corps purs au centième dans une huile minérale dépourvue d'odeur (Nujol ou Mineral Oil, Sigma). Le limonène a été présenté à une concentration de 1/62.5, et l'acide iso-valérique, le thiophénol, ainsi que la pyridine à une dilution de 1/6250. Quatre composés cristallisés, le menthol, le camphre, le thymol, et le phénol, ont été dissous de telle manière que leurs concentrations molaires soient équivalentes à une dilution au centième. Sauf pour le menthol dilué dans l'huile minérale, leur mise en solution n'a été effectuée que dans le diéthyl-phtalate, autre solvant inodore (Sigma). Cinq millilitres de solution étaient absorbés sur un support synthétique placé dans de petits flacons de 15 ml en verre ambré bouchés par une capsule vissée. Ainsi constituées, ces sources odorantes étaient disposées sur une table et

Tableau 2: Exemples de descriptions verbales d'odeurs de deux corps purs par 19 sujets naïfs. Pour un même odorant, les descriptions obtenues sont sémantiquement plus ou moins éloignées. Vicks et Valda sont des noms de marques, et spécifient, effectivement, des produits contenant des mélanges ayant des odeurs camphrées et menthées et évoquant une sensation de fraîcheur.

thiophénol

vraiment mauvais, le renfermé (les pieds!)
soufre? produit pour permanente
oeuf pourri, soufre
acide
charcuterie
cuir moisi
Feyzin, (=raffinerie de pétrole)
odeurs chimiques, boules puantes
odeur animale très forte (étable)
étouffant
ail pourri
cuisine: viande, champignons noirs, épices
cadavre, thiosulfate
fromage bien fait avec oignons mélangés
le goudron très chaud
égouts
produits chimiques, poubelle
la fermentation
odeur très désagréable de putréfaction

1,8 cinéole

camphré, Vicks
essence algérienne, menthol
mentholé, camphré?
menthe
solution mentholée
mentholée, médicament aérosol
pastille pour la gorge
médicament, hôpital, baume
sirop contre la toux
menthe, poivré, camphré?
eucalyptol
pastille Valda
pommade pour douleurs musculaires
bonbons pour la gorge, miel, eucalyptus
eucalyptus
médicament
dentifrice
odeur douce et légèrement mentholée
un médicament pour dégager les bronches

aléatoirement ordonnées. Les sujets manipulaient librement les flacons, avec leur consigne de tri: regrouper les odeurs qui présentent un air de famille.

Par ailleurs, au cours d'une expérience indépendante, nous avons demandé à dix-neuf sujets de qualifier des odeurs évoquées par chacune des 20 substances en même temps que celles correspondant à 16 sélectionnées comme familières *a priori*. Un échantillon des descriptions obtenues est présenté par le tableau 2.

Quarante sujets ont réalisé des regroupements de ces odorants sur la base d'un critère de ressemblance. Les sujets ont ensuite caractérisé verbalement chacun de leurs groupes. Les données recueillies ont permis d'établir une matrice des co-occurrences de deux odorants dans les groupes. Cette matrice a été analysée à l'aide de l'analyse factorielle des correspondances qui décrit graphiquement les relations entre les odorants.

Cette description graphique (Figure 5) nous permet surtout ici de montrer que le premier axe factoriel extrait manifestement 3 odorants du reste: Il s'agit d'un groupe de produits qui tous sont qualifiés de malodorants par les sujets et regroupés consensuellement pour cette raison. Il s'agit d'une observation classique: La dimension «hédonique» de l'odeur sert de base pour la classification des odeurs chez les sujets naïfs (Berglund et al., 1973, Schiffman, 1974).

Dans cet espace, d'autres regroupements étaient identifiables: ainsi on a observé par exemple que le cinéole, le camphre, mais aussi le l-menthol ont souvent été rassemblés par les sujets, probablement sur la base de la sensation de fraîcheur, d'origine trigéminal, qu'ils évoquent tous, mais aussi, sémantiquement, par leurs fréquentes associations dans les produits pharmaceutiques familiers. La paire p-cymène et d-limonène a souvent aussi été isolée, et leur groupe justifié par l'évocation olfactive du citron. Ces divers regroupements sont confirmés par la représentation arborescente des relations entre odeurs (Barthelemy et Guénoche, 1988) que nous livrons sur la figure 6. Avec 28 co-occurrences, la paire cinéole-menthol est la plus fréquente. Suivent les paires, méthyl amyle cétone-acétate d'iso-amyle (22), acétophénone-cyclohexanone (17), cymène-limonène (17), acide iso-valérique-thiophénol (17). L'arbre qui

représente les distances entre sujets, admet beaucoup de longues branches: les sujets ont réalisé des partitions très variées. En moyenne, avec les 20 composés, les sujets ont fait 8 groupes. Parmi les 190 appariements possibles, le sujet qui a fait le plus grand nombre d'associations n'en a fait que 38.

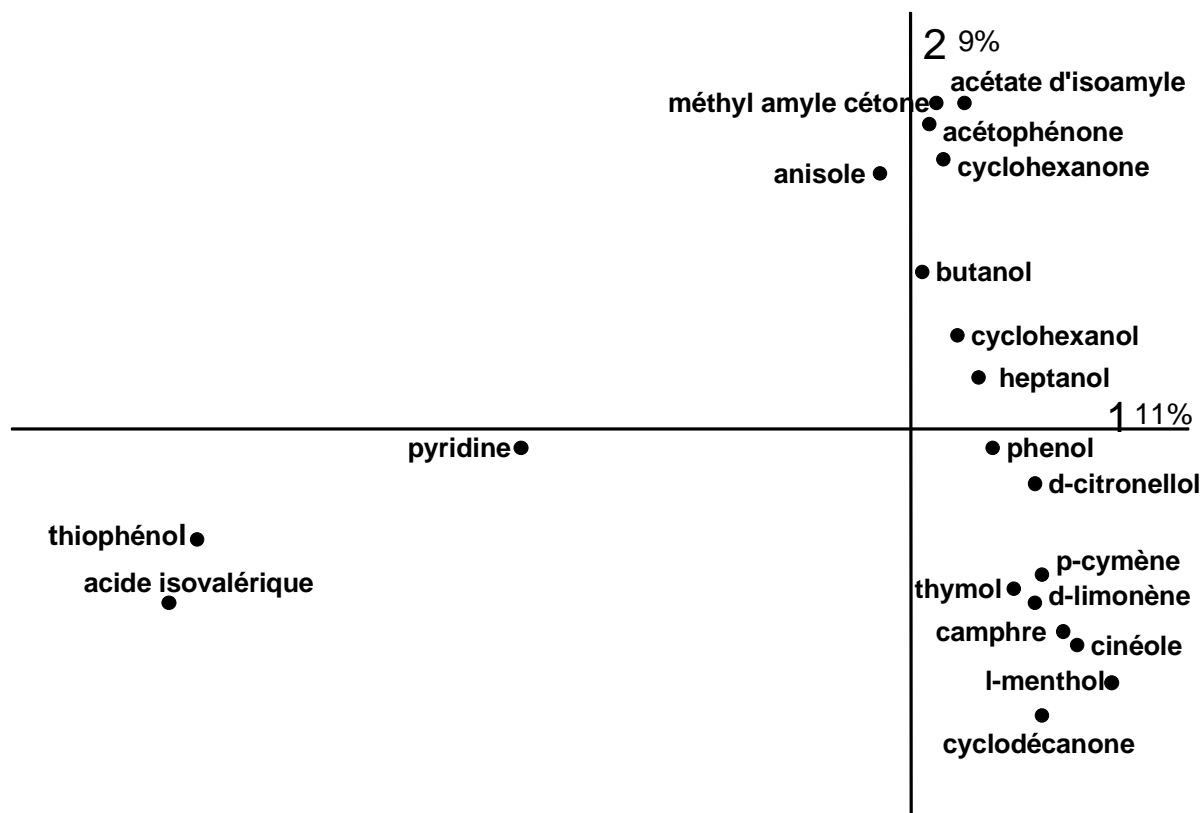


Figure 5: Premier plan factoriel d'une analyse de correspondances pratiquée sur la matrice de co-occurrences des odorants dans les groupes réalisés par 40 sujets humains au cours d'une expérience de classification de vingt odorants. Ce plan factoriel ne rend compte que de 20% de la variance totale. Le premier axe factoriel sépare clairement les mauvaises odeurs du reste.

Quels sont les points communs entre les données physiologiques olfactives et l'espace chimique?

La représentation chimique des vingt odorants, (c'est-à-dire leur description par des variables physico-chimiques), que nous proposons ici a été construite pour reproduire au mieux la représentation qu'on peut tracer sur la base des résultats de l'enquête physiologique. On suppose qu'il doit y avoir une assez forte cohérence entre un espace construit sur des bases physico-chimiques et le fruit d'interactions physico-chimiques entre molécules odorantes et récepteurs des odeurs que traduisent les réponses de neurones récepteurs olfactifs moléculaires. Il s'agit cependant pour le chimiste de réaliser un compromis: A la fois, il sait qu'en utilisant des variables globales, il sera incapable de décrire la stéréochimie des interactions, mais par ailleurs, il retient parmi toutes les descriptions possibles celles qui décrivent le mieux des forces d'interaction ou des propriétés structurales dont il suppose qu'elles sont effectivement impliquées dans les interactions olfactives. Lorsqu'on compare au travers des représentations factorielles ou des taxinomies les deux nuages, chimique et physiologique, on constate à la fois qu'ils ne sont pas superposables ou assimilables, mais aussi que certains regroupements, qui constituent les traits remarquables de ces espaces, sont

reproduits. En fait, après avoir établi des matrices de distances entre odeurs (selon Gower), nous les avons comparées en calculant les corrélations de rangs entre les 190 paires (Figure 7). Nous nous sommes aperçu alors que seules les petites distances, une quinzaine, sont bien conservées.

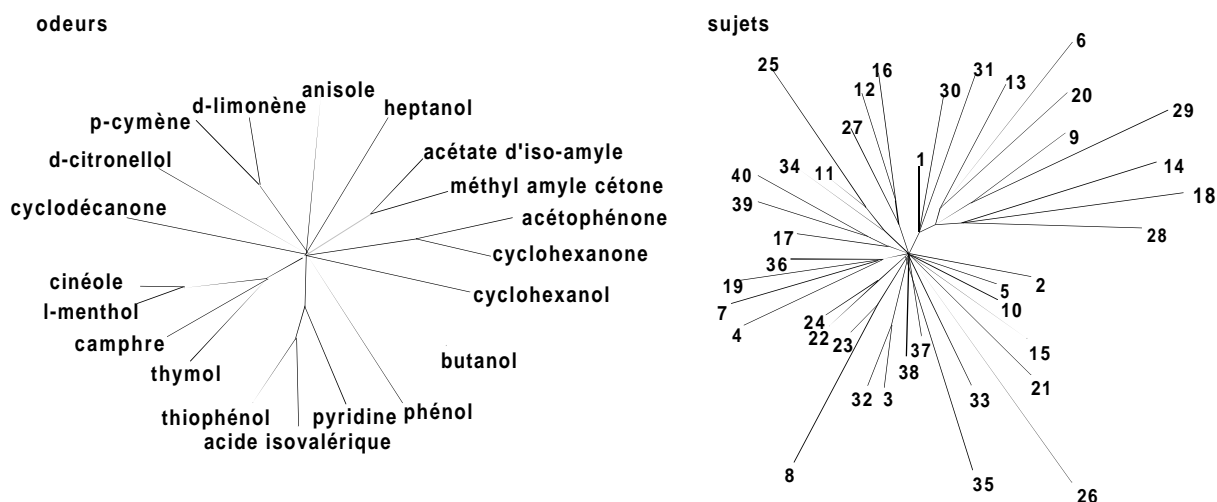


Figure 6: Résultats de l'expérience de classification d'odeurs par des sujets naïfs. Représentations par des distances entre odorants d'une part, et sujets d'autre part, au moyen d'arbres (Barthélémy et Guénoche, 1988). Certaines branches regroupent bien des odorants, comme le cymène et le limonène ou le thiophénol, l'acide iso-valérique et le thiophénol.

Comparaison entre l'espace des récepteurs et l'espace «perceptif».

En comparant l'espace construit sur la base des interactions réceptrices et l'espace construit sur la base de l'expérience de tri des odeurs par les sujets humains, nous avons voulu repérer aussi quels pouvaient être leurs points communs. Plus précisément, nous avons cherché si des distances observées à l'entrée du système étaient conservées après l'ensemble du traitement olfactif. La comparaison des matrices de distances fait apparaître que certains des regroupements effectués par les récepteurs persistent au niveau perceptif, comme, par exemple, la paire cymène-limonène. D'autres regroupements, et le groupe des mauvaises odeurs est un exemple frappant, ne peuvent pas être considérés comme analogues de ceux formés par la comparaison des réponses de cellules réceptrices. En tous cas, nous avons observé que considérant ces espaces, nous fondions naturellement nos commentaires sur les regroupements d'odorants, c'est-à-dire sur les petites distances. Comme dans le cas de la confrontation des espaces physiologiques et chimiques, si l'on compare les rangs des distances obtenues dans les représentations physiologiques et perceptives, on n'observe des corrélations significatives qu'entre une vingtaine de paires de substances chimiques reliées par de faibles distances (figure 7).

La comparaison entre l'espace construit sur la base des réponses des neurones récepteurs et celui construit par le chimiste ne semblait pas soulever d'objection majeure.

Il est évidemment plus risqué de tenter une comparaison entre les données obtenues chez des espèces différentes et à des niveaux non analogues du système de traitement de l'information. Cela a au moins un intérêt: celui d'identifier les arguments qui s'opposent à cette tentative, donc d'alimenter la discussion sur les représentations de l'odeurs, leurs analogies ou leurs différences.

La première difficulté que nous rencontrons tient au fait que rien n'indique que le répertoire des récepteurs exprimés chez la grenouille soit semblable à celui qui s'exprime chez l'homme. Plusieurs arguments peuvent d'ailleurs laisser penser que les plans d'organisation des entrées sensorielles diffèrent entre diverses espèces:

- Nous avons déjà mentionné que les mesures de sélectivité des cellules réceptrices de la grenouille et de la souris ou du jeune rat indiquent une sélectivité plus forte des neurones récepteurs du mammifère (Gesteland et al., 1982; Sicard, 1986).

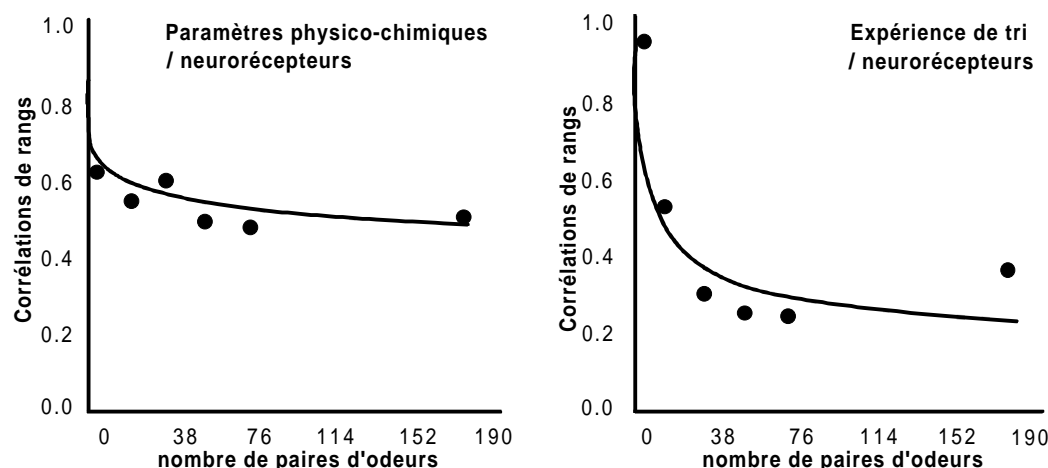


Figure 7: Distributions des corrélations de rangs entre les distances calculées pour, d'une part, les paires d'odeurs dans l'espace des neurorécepteurs, et, d'autre part, dans l'espace des variables physico-chimiques, ou celui construit sur la base d'une expérience de classification des odeurs par des sujets naïfs. Les paires d'odeurs ont été ordonnées selon les valeurs croissantes des distances obtenues dans l'espace des réponses des neurones récepteurs. Les points sont ajustés par une loi de puissance.

- L'étude de la répartition des types de récepteurs sur la muqueuse olfactive indique l'existence d'une chimiotopie périphérique chez les mammifères, absente chez le poisson ou l'oiseau (Ngai et al., 1993, Leibovici et al., 1996).

- La subdivision des territoires olfactifs, en organe récepteur «principal» et organe septal, n'est pas constante chez tous les mammifères (Rodolfo-Masera, 1943, Breipohl et al., 1983).

Nous notons cependant que des interactions avec des lots différents de récepteurs peuvent bien conduire à des descriptions très voisines des relations entre deux odorants. On n'est même pas obligé de considérer que la description de chacun des odorants obtenue par l'union de leurs multiples interactions avec le système récepteur constitue une représentation exhaustive du stimulus pour que cela soit vrai.

Une autre difficulté tient à la variabilité inter-individuelle.

S'il s'agissait de la réduire à une explication mécaniste on pourrait, par exemple, noter que plusieurs expériences ont démontré une variation de la sensibilité de l'organe récepteur en fonction d'une variation imposée dans l'environnement odorant chez plusieurs rongeurs (Wang et al., 1993, Semke et al., 1995, Youngentob et Kent, 1995). Les observations de ces auteurs sont compatibles avec l'hypothèse d'une induction de l'expression des récepteurs sous la pression de l'environnement. Elles sont aussi cohérentes avec la variabilité inter-individuelle de sensibilité classiquement observée lorsqu'on compare les seuils de détection olfactifs des sujets humains. Quelqu'en soit l'origine, celle-ci pourrait contribuer aussi à la forte variété des partitions réalisées par les sujets dans l'expérience de tri d'odeurs que nous rapportons ici.

Nous supposons néanmoins que cette variabilité des résultats individuels lors de cette expérience, n'est pas strictement réductible à une interprétation physiologique: elle intègre une dimension cognitive, mettant en jeu l'expérience et la mémoire des sujets. C'est ce que démontrent, au moins dans certains cas, les justifications que les sujets donnent des regroupements qu'ils font, et dont le groupe des mauvaises odeurs est la plus saillante illustration.

Interprétation chimique et descriptions des perceptions olfactives.

Il est clair que les sujets naïfs ne disposent pas d'un référentiel commun pour parler des odeurs et pour pouvoir les classer selon des principes admis. On peut cependant attendre que les professionnels de l'odeur, aromaticiens et parfumeurs par exemple, du fait de leur entraînement de plusieurs années dans la description des odeurs, réalisent un consensus acceptable. Le système résultant d'une centaine d'années de pratique est basé sur des notes odorantes comme boisé, floral, musc, anisé, menthé, etc... Il existe un consensus tout à fait correct sur certaines notes alors que d'autres fluctuent selon les systèmes de description. Nous avons étudié deux systèmes particuliers: celui du livre de référence de S. Arctander et un système utilisé chez Firmenich à Genève. Le premier utilise plus de 200 termes pour qualifier 2600 composés. On peut ramener à 80 mots environ ce vocabulaire, en enlevant des termes sans signification olfactive claire comme frais, chaud etc... Le second utilise une liste de 32 notes pour décrire 630 composés. La comparaison des deux systèmes à l'aide de plusieurs méthodes statistiques permet de montrer une grande ressemblance entre eux et avec la rosace des parfumeurs, un instrument entièrement empirique. Il ressort des cartes de l'espace olfactif établies sur ces bases, que cet espace a une structure faible et que seules certaines notes (par exemple, musc, anisé) sont bien individualisées (Chastrette et Zakarya, 1988, Chastrette et al., 1991). Les autres entrent dans des groupes de 2, 3 ou 4 notes qui présentent une certaine proximité. On ne peut rien dire des distances entre les groupes.

L'analyse de l'abondante littérature sur les relations entre les structures chimiques et l'odeur montre que les auteurs invoquent différentes forces d'interaction entre les molécules odorantes et les sites récepteurs. Parmi ces interactions, les plus raisonnables sont les forces de dispersion, sans orientation particulière, et la liaison hydrogène, dont la géométrie est assez stricte et qui est attendue de la part des protéines réceptrices (Chastrette et Zakarya, 1988). La combinaison des hypothèses sur les interactions et la géométrie connue des meilleurs odorants possédant une note déterminée permet de proposer des motifs osmophores correspondant à des sites récepteurs hypothétiques mais utilisables pour le choix de nouvelles molécules à synthétiser (Chastrette et al., 1990; Rognon et Chastrette, 1994). Dans l'état actuel des connaissances sur les récepteurs aucune de ces hypothèses n'a pu être vérifiée mais leur utilité dans l'industrie de la parfumerie est incontestable.

Conclusion

Qu'il s'agisse des confrontations de l'espace récepteur avec l'espace de représentation chimique d'une part, ou l'espace perceptif d'autre part, nous avons remarqué que seules les petites distances sont bien conservées d'un espace à l'autre. Existant dans l'espace construit sur la base des réponses des neurorécepteurs, ces courtes distances traduisent d'abord des similitudes d'action des molécules odorantes sur le système récepteur. Au contraire les grandes distances restent indéterminées, traduisant le fait que les ensembles d'interactions qui permettent de les établir présentent des recouvrements trop restreints pour qu'on puisse les interpréter.

Le traitement perceptif des odeurs mêle aux messages sensoriels olfactifs et actuels, des informations mémorisées, dont une partie, associations cognitives, ont pu être forgées en dehors de la sphère olfactive. Cet ajout d'informations a probablement moins de chance de rompre les relations les plus étroites entre odorants qu'élabore le système récepteur à l'entrée du système olfactif. Remarquons que le sujet naïf dispose aussi de capacités d'évaluation de similitudes dans des territoires apparemment plus larges que ceux que nous avons envisagés ici: C'est le cas, par exemple, pour les dénominations génériques odeur florale ou odeur fruitée. Nous avons constaté, en effet, que lorsqu'on propose à des sujets des odeurs familières et qu'on leur demande d'identifier la source, lorsqu'ils se trompent sur le nom de la cible, ils ont une réelle tendance à lui substituer un nom de fleur lorsque la cible présentée est une fleur, ou un nom de fruit lorsque la cible est un fruit! Alors que les sujets naïfs n'emploient que rarement les mots «floral» ou «fruité», cette observation suggère qu'ils utilisent implicitement les catégories correspondantes pour penser les odeurs.

Bibliographie

- Abraham, M.H. (1993) Scales of solute hydrogen-bonding: Their construction and application to physico-chemical and biochemical processes. *Chem. Soc. Rev.*, 22:73-83.
- Astic, L., Saucier, D., (1986) Anatomical mapping of the neuroepithelial projection to the olfactory bulb in the rat. *Brain Res. Bull.*, 16:445-454.
- Barthelemy, J.P., Guénoche, A. (1988). *Les arbres et les représentations des proximités*, Masson, Paris.
- Ben Arie, N., Lancet, D., Taylor, C., Khen, M., Walker, N., Ledbetter, D.H., Carrozzo, R., Patel, K., Sheer, D., Lehrach, H., North, M.A. (1994) Olfactory receptor genes cluster on human chromosome 17: possible duplication of an ancestral receptor repertoire. *Human molecular genetics*, 3:229-235.
- Benzecri, J.P. (1963) *L'analyse des données*, Vol. 1, 2. Dunod, Paris.
- Berglund, B., Berglund, U., Engen, T., Ekman, G. (1973) Multidimensional analysis of twenty-one odors. *Scand. J. Psychol.*, 14:131-137.
- Breipohl, W., Naguro, T., Miragall, F. (1983) Morphology of the Maser organ in NMRI mice (combined morphometric, freeze-fracture, light- and scanning electron microscopic investigations. *Verh. Anat. Ges.*, 77:741-743.
- Buck, L., Axel, R. (1991) A novel multigene family may encode odorant receptors: a molecular basis for odor recognition. *Cell*, 65:175-187.
- Buonviso, N., Chaput, M.A. (1990) Response similarity to odors in the olfactory bulb output cells presumed to be connected to the same glomerulus: Electrophysiological study using simultaneous single-unity recordings. *J. Neurophysiol.*, 63:447-454.
- Chastrette, M. (1981) An approach to a classification of odours using physicochemical parameters. *Chem. Senses*, 6:157-163.
- Chastrette, M., Elmouaffek, A., Sauvegrain, P. (1988) A multidimensional statistical study of similarities between 74 notes used in perfumery. *Chem Senses*, 13:295-306.
- Chastrette, M., Zakarya, D. (1988) Sur le rôle de la liaison hydrogène dans l'interaction entre les récepteurs olfactifs et les molécules à odeur de musc. *C. R. Acad. Sci. Paris*, 307, II:1185-1188.
- Chastrette, M., Zakarya, D., Pierre, C. (1990) Relations structure-odeur de bois de santal: Recherche d'un modèle d'interaction basé sur le concept d'hypermotif santalophore. *Eur. J. Med. Chem.*, 24:433-440.
- Chastrette, M., De Saint Laumer, J.Y., Sauvegrain, P. (1991) Analysis of a system of description of odors by means of four different multivariate statistical methods. *Chem. Senses*, 16:81-93.
- Chess, A., Simon, I., Cedar, H., Axel, R. (1994) Allelic inactivation regulates olfactory gene expression. *Cell*, 78: 823-834.
- Danty, E., Cornuet, J.M., Masson, C. (1994) Honeybees have putative olfactory receptor proteins similar to those of vertebrates. *C.R. Acad. Sci. Paris*, 317:1073-1079.
- Duchamp, A., Revial, M.F., Holley, A., Mac Leod, P. (1974) Odor discrimination by frog olfactory receptors. *Chem. Senses*, 1:213-233.
- Döving, K.B. (1974) Odorant properties correlated with physiological data. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 237:184-192.
- Edwards, D.A., Mather, R.A., Dodd, G.H. (1988) Spatial variation in responses to odorants in the rat olfactory epithelium., 44:208-211.

- Eminet, B. (1983) Contribution à l'étude physicochimique des relations structure activité dans le domaine de l'olfaction en utilisant l'analyse des données. Comparaison avec des résultats de mesures électrophysiologiques. Thèse de Doctorat de 3^{ème} cycle, Université Claude Bernard, Lyon I.
- Emptoz, H., Fages, R. (1983) A set function to cluster analysis. Proceedings of the Statistical Methods in Astronomy Symposium. Strasbourg, France, pp235-241.
- Gesteland, R.C., Lettvin, J.Y., Pitts, W.H., Rojas, A. (1963) Odor specificities in the frog's olfactory receptors. In Zotterman (ed.), *Olfaction and Taste*, vol. 11, Pergamon Press, London, pp 7-21.
- Gesteland, R.C., Yancey, R.G., Farbman, A.I. (1982) Development of olfactory receptor neurone selectivity in the rat foetus. *Neuroscience*, 7:3127-3136.
- Godinot, N., Sicard, G., Dubois, D. (1995) Categories, familiarity and unpleasantness of odours, *Odours and VOC's J.*, 3:202-208.
- Greer, C.A., Stewart, W.B., Teicher, M.H., Shepherd, G.M. (1982) Functional development of the olfactory bulb and a unique glomerular complex in the neonatal rat. *J. Neurosci.*, 6:281-292.
- Holley, A. (1991) Neural coding of olfactory information. In *Smell and Taste in Health and Disease* in Getchel et al. (eds.), Raven Press, New York, pp329-343.
- Hudson, R., Distel, H. (1987) Regional autonomy in the peripheral processing of odor signals in new-born rabbits. *Brain Research*, 421:85-94.
- Hirano, J., Sato, T., Tonoike, M., Takebayashi, M. (1994) Local distribution of odor responsiveness of mouse olfactory receptor neurones. *Neuroscience Letters*, 174:201-204.
- Jourdan, F., Dubeau, A., Astic, L., Holley, A. (1980) Spatial distribution of [C14]-2 deoxyglucose uptake in the olfactory bulbs of rats stimulated with two different odors. *Brain Res.*, 188:139-145.
- Laffort, P., Patte, F., Etcheto, M. (1974) Olfactory coding on the basis of physicochemical parameters. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 237:193-208.
- Leibovici, M., Lapointe, F., Aletta, P., Ayer-Le Lièvre, C. (1996) Avian olfactory receptors: Differentiation of olfactory neurones under normal and experimental conditions. *Developmental Biol.* 175:118-131.
- LeJeune, H., Aubert, I., Jourdan, F., Quirion, R. (1995) Comparative laminar distribution of various autoradiographic cholinergic markers in adult rat main olfactory bulb. *J. Chem. Neuroanatomy*, 9:99-112.
- Mackay-Sim, A., Shaman, P., Moulton, D.G. (1982) Topographic coding of olfactory quality: odorant specific patterns of epithelial responsivity in the salamander, *J. neurophysiol.*, 48, 584-596.
- Mac Rae, A.W., Howgate, P., Geelhoed, E. (1990) Assessing the similarity of odours by sorting and triadic comparison. *Chem. Senses*, 6, 691-699.
- Maue, R.A., Dionne, V.E. (1987) Patch-clamp studies of isolated mouse olfactory receptor neurones. *J. Gen. Physiol.* 90:95-125.
- Mori, K., Imamura, K., Mataga, N. (1992) Differential specificities of single mitral cells in rabbit olfactory bulb for a homologous series of fatty acid odor molecules. *J. Neurophysiol.*, 67:786-789.
- Mouly, A.M., Holley, A. (1985) On the ability of rats to discriminate between microstimulations of the olfactory bulb in different locations. *Behav. Brain Res.*, 17:45-58.
- Nef, P., Hermans-Borgmeyer, I., Artieres-Pin, H., Beasley, L., Dionne, V.E., Heinemann, S.F. (1992) Spatial pattern of receptor expression in the olfactory epithelium. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:8948-8952.
- Ngai, J., Chess, A., Dowling, M.M., Necles, N., Macagno, E.R., Axel, R. (1993) Coding of olfactory information: Topography of odorant receptor expression in the catfish epithelium. *Cell*, 72:667-680.
- Ressler, K.J., Sullivan, S.L. Buck, L.B. (1993) A zonal organisation of odorant gene expression in the olfactory epithelium. *Cell*, 73:597-609.
- Ressler, K.J., Sullivan, S.L. Buck, L.B. (1994) Information coding in the olfactory system: Evidence for a stereotyped and highly organised epitope map in the olfactory bulb. *Cell*, 79:1245-1255.
- Revial, M.F., Duchamp, A., Holley, A. (1978) Odour discrimination by frog olfactory receptors: a second study. *Chem. senses*, 3:7-21.
- Revial, M.F., Sicard, G., Duchamp, A., Holley, A. (1982) New studies on odour discrimination in the frog's olfactory receptor cells: I Experimental results. *Chem. senses*, 7:175-194.
- Revial, M.F., Sicard, G., Duchamp, A., Holley, A. (1983)) New studies on odour discrimination in the frog's olfactory receptor cells: II Mathematical analysis of electrophysiological responses. *Chem. Senses*, 8:179-194.
- Rodolfo-Masera, T. (1943) Su l'esistenza di un particolare organo olfattivo nel setto nasale della cavia e di altri roditori. *Arch. Ital. Anat. Embryol.* 48:157-212.
- Rognon, C., Chastrette, M. (1994) Structure-odor relationships: a highly predictive tridimensional interaction model for the bell-pepper odor. *Eur. J. Med. Chem.*, 29:595-609.
- Schiffman, S. (1974) Physicochemical correlates of olfactory quality. *Science*, 185:112-117.
- Semke, E., Distel, H., Hudson, R. (1995) Specific enhancement of olfactory receptor sensitivity associated with

- foetal learning of food odors in the rabbit. *Naturwissenschaften*, 82:148-149.
- Sicard, G. and Holley, A. (1984) Receptor cell response to odorants: Similarities and differences among odorants. *Brain Res.*, 292:283-296.
- Sicard, G. (1985) Olfactory discrimination of structurally related molecules: receptor responses to camphoraceous odorants. *Brain Res.*, 326:203-212.
- Sicard, G. (1986) Electrophysiological recordings from olfactory receptor cells in adult mice. *Brain Res.*, 397:405-408.
- Sicard, G., Royet, J.P., Jourdan, F. (1989) A comparative study of 2 deoxyglucose patterns of glomerular activation in the olfactory bulb of C57Bl/6J and AKR/J mice. *Brain Res.*, 481:325-334.
- Stewart, W.B.; Kauer, J.S., Shepherd, G.M. (1979) :Functional organization of rat olfactory bulb analysed by 2-deoxyglucose method. *J. Comp. Neurol.*, 185: 715-734.
- Strotmann, J., Wanner, I., Krieger, J. Raming, K., Breer, H. (19992) Expression of odorant receptors in spatially restricted subsets of chemosensory neurones. *Neuroreport*, 3:1053-1056.
- Vassar, R., Chao, S.K., Sitcheran, R., Nunez, J.M., Vosshall, L.B., Axel, R. (1994) Topographic organization of sensory projections to the olfactory bulb. *Cell*, 79:981-991.
- Viret-Duchamp, P., Duchamp, A. Vigouroux, M.(1989) Amplifying role of convergence in olfactory system. A comparative study of receptor cell and second -order neurone sensitivities. *J. Neurophysiol.*, 61:1085-1094.
- Wang, H.W., Wysocki, C.J., Gold, G.H. (1993) Induction of olfactory receptor sensitivity in mice. *Science*, 260:998-1000.
- Youngentob, S.L., Kent, P.K. (1995) Enhancement of odorant-induced mucosal activity patterns in rats trained on odorant identification task. *Brain Res.*, 670:82-88.
- Zatorre, R.J., Jones-Gotman, M., Evans, A.C., Meyer, E. (1992) Functional localisation and lateralisation of human olfactory cortex. *Nature*, 360:339-340.
- Zheng, L.M., Ravel, N., Jourdan, F. (1987) Topography of centrifugal acetylcholinesterase positive fibres in the olfactory bulb of the rat: Evidence for original projections in atypical glomeruli. *Neuroscience*, 23:1083-1093.