N° d'ordre **309-2012** Année 2012

THESE DE L'UNIVERSITE DE LYON

Délivrée par

L'UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON 1

ECOLE DOCTORALE Neurosciences et Cognition (NsCo)

DIPLOME DE DOCTORAT

(arrêté du 7 août 2006)

Soutenue publiquement le 14 décembre 2012

par

COURTIOL Emmanuelle

L'inextricable relation olfaction-respiration chez le Rat : Etudes de l'impact des variations de flairage sur l'activité du bulbe olfactif et sur la discrimination des odeurs

Directeur de thèse : Dr. BUONVISO Nathalie

JURY :
Dr. BUONVISO Nathalie (Directrice de thèse)
Pr. GERVAIS Rémi (Président)
Dr. GHEUSI Gilles (Examinateur)
Dr. GROSMAITRE Xavier (Examinateur)
Dr. SANDOZ Jean-Christophe (Rapporteur)
Dr. SPORS Hartwig (Rapporteur)

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1

Président de l'Université	**M. François-Noël GILLY**
Vice-président du Conseil d'Administration	M. le Professeur Hamda BEN HADID
Vice-président du Conseil des Etudes et de la Vie Universitaire	M. le Professeur Philippe LALLE
Vice-président du Conseil Scientifique	M. le Professeur Germain GILLET
Secrétaire Général	M. Alain HELLEU

COMPOSANTES SANTE

Faculté de Médecine Lyon Est – Claude Bernard	Directeur : M. le Professeur J. ETIENNE
Faculté de Médecine et de Maïeutique Lyon Sud – Charles Mérieux	Administrateur provisoire : M. le Professeur G. KIRKORIAN
UFR d'Odontologie	Directeur : M. le Professeur D. BOURGEOIS
Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques	Directeur : Mme la Professeure C. VINCIGUERRA.
Institut des Sciences et Techniques de la Réadaptation	Directeur : M. le Professeur Y. MATILLON
Département de formation et Centre de Recherche en Biologie Humaine	Directeur : M. le Professeur P. FARGE

COMPOSANTES ET DEPARTEMENTS DE SCIENCES ET TECHNOLOGIE

Faculté des Sciences et Technologies	Directeur : M. le Professeur F. De MARCHI
Département Biologie	Directeur : M. le Professeur F. FLEURY
Département Chimie Biochimie	Directeur : Mme le Professeur H. PARROT
Département GEP	Directeur : M. N. SIAUVE
Département Informatique	Directeur : M. le Professeur S. AKKOUCHE
Département Mathématiques	Directeur : M. le Professeur A. GOLDMAN
Département Mécanique	Directeur : M. le Professeur H. BEN HADID
Département Physique	Directeur : Mme S. FLECK
Département Sciences de la Terre	Directeur : Mme la Professeure I. DANIEL
UFR Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives	Directeur : M. C. COLLIGNON
Observatoire de Lyon	Directeur : M. B. GUIDERDONI
Polytech Lyon	Directeur : M. P. FOURNIER
Ecole Supérieure de Chimie Physique Electronique	Directeur : M. G. PIGNAULT
Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1	Directeur : M. C. VITON
Institut Universitaire de Formation des Maîtres	Directeur : M. R. BERNARD
Institut de Science Financière et d'Assurances	Directeur : Mme la Professeure V. MAUME-DESCHAMPS

Mon travail de thèse a été effectué au sein du Centre de Recherche en Neurosciences de Lyon dans l'équipe Olfaction du codage à la mémoire dirigée par le Pr. R. Gervais (CNRS UMR 5292, INSERM U 1028, Université Claude Bernard Lyon 1). Ma thèse a été réalisée sous la direction du Dr. Nathalie Buonviso. Cette thèse a été financée grâce à une bourse ministérielle qui a débuté en octobre 2009. Cela m'a permis de réaliser un monitorat en physiologie. J'ai également eu la chance de pouvoir réaliser un séjour d'un peu plus d'un mois au sein du laboratoire de Zachary Mainen à Lisbonne à l'aide d'un financement de la FENS (NENS, Stipends for Training Stays) et de l'ECRO.

Les résultats obtenus au cours de ma thèse font l'objet de deux publications en premier auteur (pages 77 et 91) et d'une étude non publiée (page 104). J'ai également participé à deux collaborations qui font l'objet de 2 publications en second auteur (pages 182 et 194). Les références de ces publications sont les suivantes :

Articles en premier auteur:

- **Courtiol E.,** Amat C., Thévenet M., Messaoudi B., Garcia S., Buonviso N. (2011a) Reshaping of bulbar odor response by nasal flow rate in the rat. *PLoS One.* 6:e16445.

- **Courtiol E.,** Hegoburu C., Litaudon P., Garcia S., Fourcaud-Trocmé N., Buonviso N. (2011b) Individual and synergistic effects of sniffing frequency and flow rate on olfactory bulb activity. *J Neurophysiol.* 106:2813-24.

Articles en second auteur:

- Fourcaud-Trocmé N., **Courtiol E.**, Buonviso N., Voegtlin T.(2011)Stability of fast oscillations in the mammalian olfactory bulb: experiments and modeling.*J Physiol Paris.* 105:59-70.

- Esclassan F., **Courtiol E.**, Thevenet M., Garcia S., Buonviso N., Litaudon P. (2012) Faster, deeper, better: The impact of sniffing modulation on bulbar olfactory processing. *PloS One.* 7: e40927.

Ces résultats ont été présentés lors de communications orales :

- 2012, Janvier, Post dc Meeting CNRS-Max Planck (January 19th 2012) Individual and synergistic effects of sniffing frequency and flow rate on olfactory bulb activity.

- 2012, Juin, Harvard University, Uchida's Lab, The inextricable relationship between olfaction and respiration.

- 2012, Juin, New York University, Wilson's Lab, The inextricable relationship between olfaction and respiration.

Ces résultats ont également été présentés sous la forme de communications affichées, dont il est possible de retrouver les résumés et les posters dans la partie annexes de ce manuscrit :

- 2009; *ECRO*: How nasal airflow shapes odor representation at the olfactory bulb level.
  Emmanuelle Courtiol, Marc Thevenet, Belkacem Messaoudi, Samuel Garcia, Nathalie Buonviso.

- 2010; *FENS*: Current source-density (CSD) analysis of respiration-related slow rhythm and fast beta and gamma oscillatory rhythms in the olfactory bulb of freely breathing rats.
  Nicolas Fourcaud-Trocmé, **Emmanuelle Courtiol,** Nathalie Buonviso.

- 2010; *Proceedings NeuroComp*: Stable frequency response to varying stimulus intensity in a model of the rat olfactory bulb.
  Thomas Voegtlin, Corine Amat, Virginie Briffaud, Nathalie Buonviso, **Emmanuelle Courtiol**, Nicolas Fourcaud-Trocmé.

- 2011; *Society of French Neuroscience*: How nasal airflow shapes spatio-temporal representation of odors at the olfactory bulb level: an optical imaging study.
  Philippe Litaudon, **Emmanuelle Courtiol,** Marc Thevenet, Belkacem Messaoudi, Samuel Garcia, Nathalie Buonviso, Frederic Esclassan.

- 2011; *Society of French Neuroscience*: Respiratory-related odor sampling: deciphering the effects of frequency and flow rate variation on olfactory bulb activity.
  Emmanuelle Courtiol, Frederic Esclassan, Nicolas Fourcaud-Trocmé, Samuel Garcia, Philippe Litaudon, Nathalie Buonviso.

- 2011; *GDR multielectrode*: Temporal relationship between sniffing frequency, olfactory bulb respiration-related activity and hippocampus thêta waves.
  Emmanuelle Courtiol, Nicolas Fourcaud-Trocmé, Nathalie Buonviso.

- 2011; *Champalimaud Neuroscience Symposium:* Why sniff strong when sniff fast : deciphering the effects of frequency and flow rate variation on olfactory bulb activity.
  Emmanuelle Courtiol, Frederic Esclassan, Nicolas Fourcaud-Trocmé, Samuel Garcia, Philippe Litaudon, Nathalie Buonviso.

- 2012; *Hertie Winter School:* Why sniff strong when sniff fast: deciphering the effects of frequency and flow rate variation on olfactory bulb activity.
  Emmanuelle Courtiol, Frederic Esclassan, Nicolas Fourcaud-Trocmé, Samuel Garcia, Philippe Litaudon, Nathalie Buonviso.

- 2012; *ACHEMS:* Could sniffing variations improve olfactory perception?
  Emmanuelle Courtiol, Belkacem Messaoudi, Marc Thévenet, Samuel Garcia, Nathalie Buonviso.

L'inextricable relation olfaction-respiration chez le Rat :
Etudes de l'impact des variations de flairage sur l'activité du bulbe olfactif et sur la discrimination des odeurs

RESUME

Chez les mammifères terrestres, l'échantillonnage des odeurs, que l'on nommera flairage, est inextricablement lié à la respiration. Le flairage contraint à la fois le décours temporel et l'intensité de l'input olfactif. Or le flairage est un acte dynamique, il peut varier aussi bien en fréquence qu'en débit. Dans une première partie de mon travail de thèse, nous avons souhaité caractériser l'impact des variations de fréquence et de débit respiratoire sur l'activité du premier relais central de l'information odorante : le bulbe olfactif. Pour cela, nous avons mis au point une méthode de double trachéotomie chez le rat anesthésié nous permettant de contrôler précisément les flux d'air dans la cavité nasale. En parallèle, nous avons enregistré l'activité unitaire et de réseau du bulbe olfactif. Nous montrons que les variations de flairage modulent la représentation neuronale des odeurs au niveau du bulbe olfactif en modifiant à la fois l'activité de décharge des cellules mitrales et à panache et l'occurrence des oscillations du potentiel de champ local. Dans une seconde partie de ma thèse, nous avons souhaité comprendre quel pouvait être le rôle du flairage chez un animal qui se comporte. Plus spécifiquement, nous avons posé l'hypothèse qu'un animal pouvait adapter sa façon de flairer en fonction de la qualité des molécules odorantes. Pour tester cette hypothèse, nous avons mis au point un système d'enregistrement non invasif de la respiration couplé à une tâche de discrimination olfactive chez le rat. Nous montrons non seulement que les animaux peuvent adapter leur flairage en fonction des molécules odorantes mais également en fonction du contexte dans lequel l'odeur est présentée. L'ensemble de ces résultats s'intègre donc dans la problématique plus générale de l'intégration sensori-motrice et permet de démontrer que le système olfactif dispose, comme les autres sens, d'un acte sensori-moteur.

DISCIPLINE : Neurosciences

MOTS-CLES : Bulbe olfactif, respiration, activité unitaire extracellulaire, potentiel de champ local, discrimination olfactive

INTITULE ET ADRESSE DE L'U.F.R. OU DU LABORATOIRE :

Centre de Recherche en Neurosciences de Lyon, Equipe : olfaction du codage à la mémoire
CNRS UMR 5292, INSERM U1028, Université Claude Bernard Lyon150 avenue Tony Garnier
69366 Lyon cedex 07

The inextricable relationship between olfaction and respiration in the Rat :
Study of the impact of sniffing variations on bulbar activity and on odor discrimination

ABSTRACT

In terrestrial mammals, an inextricable link between olfaction and respiration exists due to the periodic sampling of odorant molecules by inhalation. The features of sniffing (or breathing) constrain both the timing and the intensity of the input to the olfactory structures. But rather than being fixed, sniffing in the behaving rodent is highly dynamic and varies both in frequency and flow rate. During the first stage of my PhD, I asked to what extent sniffing parameters (frequency and flow rate) variations could affect the olfactory bulb activity. To address this question, I developed a double tracheotomy protocol in anesthetized rats to precisely control and modify the nasal airflow. In parallel, I recorded olfactory bulb activities, single-unit activity and local field potentials. We showed that, at the olfactory bulb level, the neural representation of an odor is highly modified by sampling variations. In fact both the mitral/tufted cell discharge patterns and local field potentials oscillations were affected by sniffing variations. In the second stage, we wanted to understand the role of sniffing variations in behaving animals. We hypothesized that an animal could adapt its sniffing strategy relative to the quality of the odorant molecules. To test this hypothesis, we developed a tool to record sniffing in a non invasive way, and combined it to an olfactory discrimination task in the rat. We showed that animals not only adapted their sniffing relative to the odorant quality but also to the odorant context. Taken together, these results fit into the broader context of sensory-motor integration.

Remerciements

J'arrive au terme de ma thèse et à cet effet, je souhaite remercier un certain nombre de personnes. Une thèse n'est pas seulement une aventure personnelle, c'est aussi des interactions et personnes grâce à qui j'ai appris, progressé et sans qui cette aventure n'aurait pas été possible.

Tout d'abord, je remercie le Dr. Sandoz et le Dr. Spors d'avoir accepté d'être les rapporteurs de cette thèse.

Je remercie ensuite le Dr. Gheusi et le Dr. Grosmaitre d'avoir accepté d'être les examinateurs de cette thèse.

Je remercie le Pr. Gervais non seulement d'avoir accepté d'être le président du jury de ma thèse mais surtout d'avoir toujours manifesté son intérêt pour mes travaux. J'ai apprécié vos encouragements et votre enthousiasme à mon égard. Je vous remercie de m'avoir accueillie et intégrée dans votre laboratoire.

Je remercie le Dr. Nathalie Buonviso. Je suis arrivée en début de Master 2 au laboratoire, tu m'as tout appris et tu as construit le chercheur que je suis aujourd'hui. Tu m'as appris ce qu'est la vraie science, à l'aimer et à toujours regarder mes données brutes. Je ne connais aucun autre chercheur avec ton degré de connaissance, ta passion pour la recherche, tes idées toujours nouvelles. J'aimerais devenir le chercheur que tu es. Mais en plus ces qualités scientifiques, tu es une personne exceptionnelle. Tu as su me parler, me guider pour donner le meilleur de moi-même. Tu as su me réconforter dans les moments de doute. Tu m'as permis de faire tout ce dont j'avais envie et notamment la manip de comportement. Tu m'as encouragée à faire des écoles d'hiver, à aller à des congrès et à présenter mes données. Tu m'as offert tellement d'opportunités pour progresser. Tu ne considères pas les étudiants comme des étudiants mais comme des chercheurs en devenir avec lesquels tu intéragis, il est si facile et agréable de travailler avec toi. Il n'y a pas eu un jour où je n'ai pas eu envie de venir au labo, tu m'as fait aimer tout ce que j'ai fait. Nous avons eu une relation fusionnelle : ententes scientifique et humaine. Tout le monde me disait qu'en fin de thèse, on en a marre de son chef, ce n'est toujours pas le cas pour moi. Et je n'ai qu'une seule envie, partir pour vite revenir. Merci de m'avoir tout donné et pour tous les moments inoubliables passés ensemble (aussi bien en bas du labo que dans des lieux plus exotiques comme L.A. ou La Sardaigne). Je ne suis pas sûre que ce paragraphe soit très structuré (!) mais cela vient comme je le pense et je ne pourrais jamais assez te remercier en quelques lignes, alors encore une fois : Merci (je t'ai toujours dit que j'adorais le comique de répétition !!!).

Ensuite, un paragraphe spécial pour l'ancienne équipe Buonviso, ma famille du labo. Tout d'abord merci Corine, c'est grâce à toi que j'ai fait mon M2 avec Nath, tu m'as soutenue pour les enseignements et tu as toujours été là. Merci Nico, ta gentillesse n'a d'égal que tes prouesses en math (et c'est peu dire). Enfin merci Philippe. Philippe, je t'adore. Tes gentilles moqueries me manquent déjà…Tes petites blagues et anecdotes m'ont toujours fait du bien ! Je ne sais toujours pas prendre de photo, mais j'ai appris à me servir proprement de word ! Tu as partagé tes connaissances sur l'imagerie, tu as toujours été là pour répondre à mes nombreuses questions sur la thermodynamique, les concentrations… j'ai beaucoup appris avec toi.

Je remercie ensuite l'ensemble du laboratoire. Je ne suis pas sûre qu'il existe de meilleur laboratoire pour former des chercheurs (oui je sais, je suis tout à fait objective !!). Non seulement l'ambiance y est bonne mais tout est fait pour que les projets y soient menés à bien. Commençons d'abord par la cellule administrative, merci de nous rendre la vie si facile. Et surtout gérer/supporter mon stress avec tout ce qui concerne les papiers administratifs. En particulier, Merci Florence L., non seulement tu es extrêmement efficace mais en plus tu es trop sympa! Je n'oublierais pas que la première personne dans les bras de qui j'ai pleuré quand j'ai réussi le concours de bourse de thèse, c'était toi ! Ensuite, la cellule R&D, que ferions-nous sans vous ? Merci Marc pour ratus martin !, merci Sam. Sam, un vrai génie, et même si parfois, nous avons eu des désaccords, cela tombe sous le sens, tu vois les choses du côté programmation et moi du côté manips, je suis heureuse d'avoir travaillé avec toi, c'est grâce à toi que désormais, je peux dire que je connais bien python ! Ensuite, merci Bel. Non seulement l'électronique et toi ça ne fait qu'un mais j'ai adoré monter le poste de comportement avec toi. Et surtout j'ai rencontré une belle personne, une personne humaine pleine de bonnes intentions et de petites attentions. Ensuite, un grand merci à toutes les personnes des 3 équipes qui forment désormais le laboratoire. Merci en particulier à toutes les personnes de l'équipe Gervais, vous êtes tous géniaux. Il y a ensuite quelques personnes avec qui j'ai eu la chance de partager plus que de la science. Merci Ounsa pour t'occuper si bien de mes ratus et pour les spécialités à base de datte ! Merci Karyn de m'avoir

soutenue pour les cours et pour tous les moments que nous avons partagés… Merci Nadine et Anne-Marie, vous partagez le même bureau mais aussi une grande qualité, vous êtes de belles personnes. Vous m'avez soutenue, vous m'avez prodigué vos conseils pour le comportement et l'électrophy chez le vigile, vous m'avez écoutée et vous m'avez fait me sentir comme un membre statutaire de ce labo ! Vous avez une place bien spéciale pour moi !

Au labo on passe beaucoup de temps, beaucoup plus que chez soi, et on apprend à connaitre les personnes qui partagent le même espace de vie. Je voudrais remercier tous ceux qui sont passés par le bureau 108. Me supporter des heures et des heures n'a pas dû être facile ! En particulier, merci Tristan pour m'avoir passé le relai, merci Maxime S., merci Fred (l'autre !) pour les couinches, merci Dolly pour le Liban, merci Sarah pour la saucisse. Même si tu n'es pas du bureau 108, merci Chloé j'ai appris à te connaitre et j'ai apprécié cela surtout dans la dernière ligne droite ! De ces gens avec qui l'on passe tant de temps, certains deviennent des amis. Je pense tout d'abord à Pascaline, il y a des gens avec qui ça colle de suite et tu en fais partie… j'espère que notre amitié continuera outre atlantique ! Ensuite Virginie, depuis le début, de A à Z, dans toutes les situations toujours ensembles, même jusqu'à ce qu'on nous mélange ! C'était super de t'avoir à mes côtés et quand tu es partie, ça a fait un grand vide. Enfin merci Fred ! Alors déjà merci pour la musique… Merci pour les discussions scientifiques, les soirées partagées, les pauses, ton déménagement avec la table en verre en miette dans mes mains, une bonne entrecôte et les va fumer maintenant (merci pour ma santé !)… Merci d'être ce que tu es et de m'avoir permis de le découvrir.

Un grand merci à tous d'avoir été là dans les bons moments mais aussi pour les coups durs (du genre mon papier s'est fait jeter…).

Une thèse n'est pas seulement un investissement professionnel, c'est aussi beaucoup d'investissement personnel. J'ai la chance fabuleuse d'avoir des parents, grand parents, tantes, oncles et un frère qui m'ont soutenue du début de ce projet jusqu'à son aboutissement. Vous êtes fiers de moi et vous me le montrez, cela me force et me motive à continuer. Vous avez toujours approuvé mes choix et aidé à réaliser mes objectifs. Merci Papi et Mamie, de m'avoir donné le goût des études et du dépassement de soi. Papa, Maman, Max, nous sommes une vraie famille, toujours là les uns pour les autres et cette thèse est pour vous. Vous êtes ma vie. Merci Papa d'être fier comme un coq de ta gamine (bon j'ai 25 ans alors je suis plutôt une grande fille). Merci Maman, tu es la meilleure de toutes, tu as toujours cru en moi et tu peux croire en toi. Merci Max, mon frère et merci la boxe, prochaine fois un crochet du droit et tu seras KO, la boxe anglaise est mieux que la boxe thai !

Merci Arthur, tu partages ma vie depuis 7 ans, tu es celui qui a su me rassurer, me déstresser, nous nous complétons et sans toi, cette aventure n'aurait pas pu être menée à bien ou en tout cas pas si bien. Merci d'avoir accepté ces week ends de manips, semaine à horaires sans jamais me faire de reproche mais plutôt en m'encourageant et en étant fier de moi. A cet instant, je n'imagine pas le futur le sans toi. Alors prêt pour une nouvelle aventure ? Je remercie également toute ma belle famille, là aussi vous m'avez toujours soutenue parents, grand parents et tantes ! Merci Cloth d'avoir partagé les premiers mois de ma thèse et mes premiers posters en anglais… Merci Ed, pour les fous rires et les réveils à 5h30 (avec une manip qui commence à 7h30 le dimanche !).

Merci à ma deuxième famille : mes amis. Par « ancienneté », Boris, Maitre Truy, tu m'as vu nourrisson et me voilà ta sœur de cœur. On sait d'où l'on vient et merci d'avoir cru en moi ! Ensuite Merci Gigi, depuis la crèche sans discontinuer. Je ne peux résumer mais tu es extraordinaire et je suis chanceuse d'avoir eu ton soutien sans faille, notre complicité n'a pas d'égal! Jeremy, nous sommes des âmes sœurs… Tu me comprends et me soutiens, merci. Pierre, d'un copain tu es devenu un ami puis mon soleil du jeudi soir, merci ! Doudou et Coco, le couple stable, merci pour tous nos moments partagés surtout à Chenay ! Alex, mon coloc de la résidence Jussieu… Merci pour l'initiation à la couinche ;). Merci Amélie D., depuis la résidence de Stael, tu as toujours été là, ton optimisme m'a vraiment fait du bien. Enfin, merci Audrey, nous sommes les sœurs jumelles de la BU. Nous avons passé ensemble des moments magiques et ton soutien a été infaillible.

Un dernier merci, à tous les rats qui ont participé à ces résultats. Ce sont des animaux fantastiques.

MERCI à TOUS

Sommaire

1 INTRODUCTION 3

1.1 Avant propos- Représentation de l'information sensorielle 4
1.1.1 Le codage spatial : Une photographie 4
1.1.2 Le codage temporel : un film 5

1.2 Description du système olfactif : Anatomie et synaptologie 7
1.2.1 Epithélium olfactif : l'étage d'entrée 7
1.2.2 Bulbe olfactif : premier relais central de l'information odorante 15
1.2.3 Intégration du message olfactif au niveau bulbaire 23

1.3 L'inextricable relation olfaction - respiration : «Car l'odeur était sœur de la respiration… » (P. Suskind, extrait de « Le Parfum ») 31
1.3.1 La respiration, un acte moteur indispensable à la perception olfactive 32
1.3.2 Les supports anatomo-fonctionnels de l'inextricable relation olfaction-respiration 33
1.3.3 Tous au rythme respiratoire : effets de la respiration sur l'activité du système olfactif 39
1.3.4 Respiration et perception olfactive 52

1.4 Position du problème : Impacts des variations de flairage sur l'activité du système olfactif et sur la discrimination olfactive 58
1.4.1 Contexte général 58
1.4.2 Questions posées 59

2 MATERIELS ET METHODES 61

2.1 Découpler le flux d'air nasal de la respiration de l'animal et le contrôler (études 1-2) 62
2.1.1 Double canulation chez le rat anesthésié 62
2.1.2 Contrôle de l'air passant dans la cavité nasale 62

2.2 Les signaux électrophysiologiques chez l'animal anesthésié (études 1-2) 64
2.2.1 Enregistrer l'activité bulbaire chez l'animal anesthésié (études 1-2) 64
2.2.2 Les outils pour analyser les données électrophysiologiques 64

2.3 Enregistrer la respiration chez un animal impliqué dans une tâche de discrimination olfactive (étude 3) ... 66
2.3.1 Enregistrer la respiration chez un animal vigile 66
2.3.2 Le choix d'une tâche de discrimination olfactive 66
2.3.3 Tâche de discrimination alternative à deux choix 67

3 RESULTATS 69

3.1 Validations du protocole de double canulation 70
3.1.1 Validation du flux d'air nasal : reproduire chez le modèle canulé des réponses similaires à celles enregistrées chez l'animal respirant librement 70
3.1.2 Validation : découpler et désynchroniser la respiration imposée de la respiration de l'animal 71

3.2 Importance de la mécanosensibilité de l'EO pour l'activité spontanée du BO (étude 1) 73
3.2.1 Contexte et résumé 73
3.2.2 Résultats (étude 1) 74

3.3 Effets des variations de paramètres respiratoires sur l'activité bulbaire (études 1 et 2) 75
3.3.1 Effet du débit respiratoire 75
3.3.2 Effets conjoints du débit et de la fréquence respiratoire 88

3.4 Modulation de la dynamique respiratoire en fonction de la qualité des molécules odorantes (étude 3)... 104

3.4.1 Contexte et résumé 104
3.4.2 Etude 3 105

4 DISCUSSION GENERALE 130

4.1 Considérations méthodologiques 132
4.1.1 Le modèle anesthésié 132
4.1.2 L'enregistrement de la respiration 132

4.2 La rythmicité respiratoire dans le système olfactif 134
4.2.1 Les différentes origines possibles 134
4.2.2 Rôle(s) du rythme respiratoire pour le système olfactif 137
4.2.3 Existe-t-il un analogue du rythme respiratoire chez les espèces qui n'ont pas de respiration pulmonaire ? 139

4.3 Aparté sur l'invariant de l'odeur 141

4.4 L'acte olfacto-moteur 142
4.4.1 Les preuves de l'existence d'un circuit olfacto-moteur 142
4.4.2 Les voies anatomiques possibles 142
4.4.3 Supports de communication entre les aires du circuit olfacto-moteur : des hypothèses sur les rythmes cérébraux et perspectives de travail 146
4.4.4 Rôle(s) du contrôle olfacto-moteur 151

4.5 Conclusion générale 153

5 REFERENCES 154

6 ANNEXES 180

6.1 Articles en second auteur 181

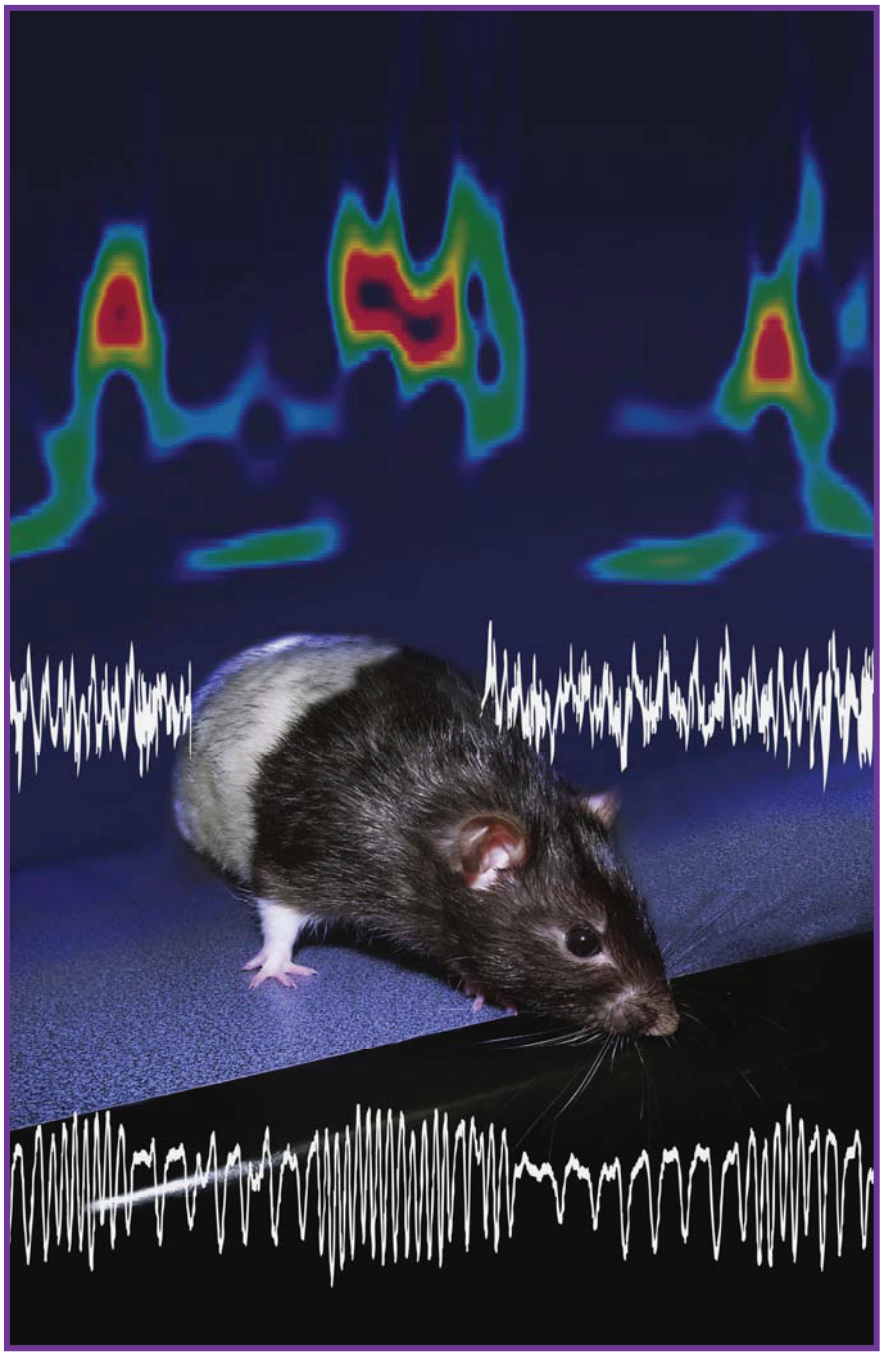
6.2 Posters 204

Liste des abréviations

Abréviations	Nom complet
2 DG	2 déoxyglucose
AMPA	Acide α-Amino-3-hydroxy-5-Methylisoazol-4-Propionate
AMPc	Adénosine monophosphate cyclique
BO	Bulbe Olfactif
Cellules AC	Cellules à axone court
Cellules G	Cellules granulaires
Cellules M	Cellules Mitrales
Cellules P	Cellules à Panache
Cellules PG	Cellules périglomérulaires
CNG	Canal Cyclic-Nucleotide-Gated
EO	Epithélium olfactif
EOG	Electroolfactogramme
GABA	Acide Gamma-Amino-Butyrique
Ih	Courant cationique activé par l'hyperpolarisation
Inap	Courant sodique persistant
NMDA	Acide N-Méthyl-D-Aspartique
NO	Nerf olfactif
NR	Neurorécepteur olfactif
NS	Pattern de décharge non synchronisé à la respiration
PCL	Potentiel de Champ local
OBP	Odorant binding protein
S+	Pattern de décharge simple synchronisé excitateur
S-	Pattern de décharge simple synchronisé inhibiteur
Sc	Pattern de décharge complexe synchronisé
Synchro	Pattern de décharge synchronisé à la respiration (S+, S- ou Sc)
TOL	Tractus olfactif latéral

«Car l'odeur était sœur de la respiration. Elle pénétrait dans les hommes en même temps que celle-ci; ils ne pouvaient se défendre d'elle, s'ils voulaient vivre. *Et l'odeur pénétrait directement en eux jusqu'à leur cœur, et elle y décidait catégoriquement de l'inclination et du mépris, du dégoût et du désir, de l'amour et de la haine. Qui maîtrisait les odeurs maîtrisait le cœur des hommes.»*

Patrick Süskind extrait de « Le parfum ».



Cette illustration a été proposée et acceptée pour être la page de couverture du journal of Neurophysiology (Décembre 2011)

1 INTRODUCTION

1.1 Avant propos- Représentation de l'information sensorielle

Sans cesse, notre cerveau doit analyser, décoder notre environnement. Quel code utilise-t-il? Quel est son mode de fonctionnement ? Quel est le langage des neurones ? Toutes ces questions ont passionné et continuent de passionner de nombreux chercheurs et ce depuis l'antiquité. Différentes théories du codage neuronal ont été mises en avant, tantôt acceptées tantôt formellement rejetées par la communauté scientifique. De façon générale, deux grands types de représentation de l'information sont considérés au niveau cortical : le premier sous forme d'information spatiale et le deuxième sous forme d'information temporelle. En ce qui concerne le codage spatial, on trouve ce type de représentation de l'information dans différentes modalités sensorielles: la vision avec la rétinotopie et l'audition avec la tonotopie. J'illustrerai le codage spatial ainsi que le codage temporel en m'appuyant sur l'exemple de la représentation corticale des vibrisses dans le cortex somato-sensoriel du rongeur.

1.1.1 Le codage spatial : Une photographie

Les vibrisses sont organisées de façon spécifique autour de la gueule et du nez du rat (Deschênes *et al.*, 2012). Mécaniquement, les vibrisses jouent le rôle de levier, leur déplacement active des mécano-récepteurs situés au niveau du follicule de la vibrisse. Cette information est alors conduite par le nerf trigéminal pour venir faire synapse au niveau du noyau trigéminal. Les neurones de ce dernier se projettent jusqu'au thalamus, et enfin l'information parvient jusqu'à la couche IV du cortex somato-sensoriel (Pour revue, Petersen, 2007). Woolsey et Van Der Loos (1970) ont observé au niveau de la couche IV du cortex somato-sensoriel, une architecture spécifique : sorte de patchwork dont chaque pièce ressemblait à un tonneau (en anglais, le nom donné est barrel cortex). Ils ont démontré que chaque tonneau (« barrel ») représentait une vibrisse. Et c'est ce patchwork qui nous intéresse. Effectivement, chaque vibrisse est topographiquement représentée au niveau du cortex somato-sensoriel (Fig. 1A,B). L'activation de différentes vibrisses induit donc la formation d'une carte d'activation spécifique, une photographie de leur activité à un instant t, c'est ce qu'on appelle la somatotopie.
Le système olfactif possède, lui aussi, une représentation spatiale de l'information odorante. Mais cette représentation est beaucoup moins organisée que dans le système somato-sensoriel, c'est une représentation topographique grossière.

1.1.2 Le codage temporel: un film

La fréquence des mouvements des vibrisses est comprise entre 3 et 15 Hz (Cao *et al.*, 2012). Le cerveau doit donc non seulement intégrer quelle vibrisse est activée mais également la séquence d'activation afin de pouvoir réaliser un « film » de l'environnement exploré. On peut, par exemple, observer une carte spatiale d'activation du cortex somato-sensoriel en réponse au mouvement de la vibrisse C2 (Fig. 1C). Cependant, comme le montre la figure 1C, cette carte évolue dans le temps: la réponse augmente en amplitude et se propage horizontalement (Ferezou *et al.,* 2006). La dynamique temporelle d'activation du cortex somato-sensoriel est donc un paramètre critique dans la représentation des stimuli. Intégrer le facteur temporel semble d'autant plus important que la principale théorie du codage temporel de l'information repose sur les premiers postulats de Hebb (Hebb, 1949). La représentation d'un stimulus serait déterminée par l'activation simultanée de plusieurs neurones. L'activation ou synchronisation de différents neurones forment une assemblée. Et dans le système somato-sensoriel, il a été proposé que la rythmicité des mouvements de vibrisses permettrait de synchroniser et de former des assemblées de neurones (Poulet et Petersen, 2008).

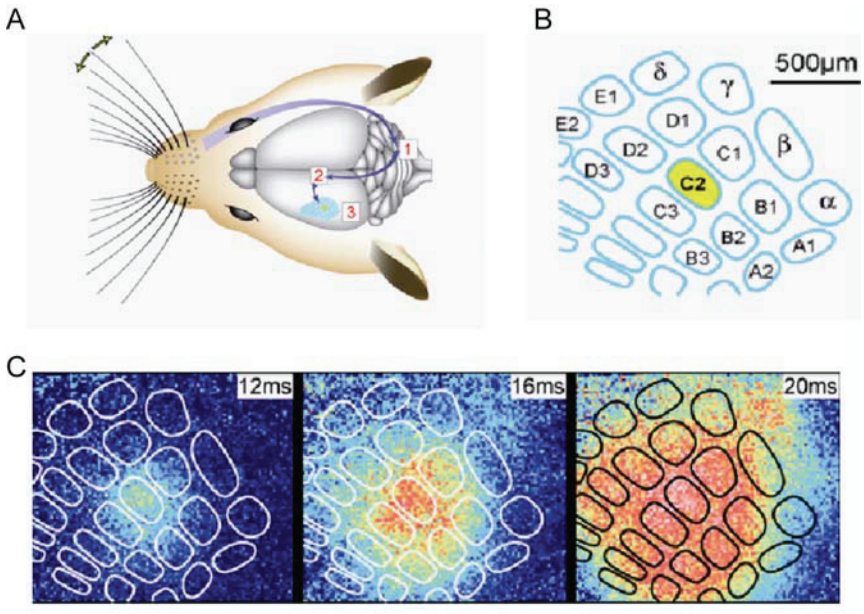


Figure 1: A) Photographie de la disposition des vibrisses d'un rat. B) Représentation corticale de chacune de ces vibrisses au niveau de la couche IV du cortex somato-sensoriel C) Dynamique d'activation du cortex somato-sensoriel mesurée en imagerie grâce à un colorant voltage-dépendant. Au fur et à mesure du temps, la carte d'activation évolue à la suite de la stimulation de la vibrisse C2. Figures adaptées d'après Petersen, 2007.

Qu'en est-il de la dynamique temporelle dans le système olfactif ? Qu'est ce qui détermine l'activation temporelle du système olfactif ?

La dynamique des stimuli dans le système olfactif est conditionnée par leur mode d'échantillonnage *via* la respiration. Cette dernière, comme on le verra au cours de ce manuscrit,

n’est pas seulement le vecteur des molécules odorantes (Mainland et Sobel, 2006), elle conditionne également l’activité de l’ensemble du système olfactif. La respiration se place ainsi comme un facteur clé pour la représentation neuronale des odeurs et il est donc nécessaire d’étudier sa relation avec le système olfactif.

Au cours de ce manuscrit, nous allons tout d’abord décrire le système olfactif en nous axant de façon plus spécifique sur le bulbe olfactif (BO), structure étudiée au cours de ma thèse. Ensuite, nous verrons comment la respiration contrôle l’ensemble de l’activation du système olfactif à la fois sur le plan spatial mais aussi et surtout temporel.

1.2 Description du système olfactif : Anatomie et synaptologie

Au cours de ce chapitre, nous allons décrire l'anatomie fonctionnelle du système olfactif en nous attardant sur les points qui seront capitaux pour notre problématique.

1.2.1 Epithélium olfactif: l'étage d'entrée

1.2.1.1 Anatomie

L'épithélium olfactif (EO) se trouve au fond de la cavité nasale et tapisse la paroi des cornets olfactifs. C'est un épithélium pseudo-stratifié, principalement composé de trois types de cellules (Fig. 2) :

- Les neurorécepteurs olfactifs (NR) sont des neurones bipolaires différenciés en chimiorécepteurs. Les neurorécepteurs sont composés d'un soma, de diamètre moyen de 10µm (chez le rat), d'une dendrite et d'un axone (Fig. 2). Les neurorécepteurs portent à leur surface apicale (côté cavité nasale) une dendrite primaire qui se termine par une vésicule portant une vingtaine de cils olfactifs. Ces cils portent les protéines réceptrices aux odeurs et baignent dans un mucus visqueux fait de mucopolysaccharides. Les neurorécepteurs olfactifs sont les acteurs principaux de cet étage d'entrée. Ils permettent la transduction du message chimique en un message électrique qui est acheminé vers le premier relais central de l'information odorante : le bulbe olfactif (BO).
- Les cellules de soutien sont disposées verticalement autour des neurorécepteurs. Elles permettent, en autre, de réguler le milieu osmotique des neurorécepteurs.
- Les cellules basales sont au pôle basal de l'EO. Les cellules basales horizontales se divisent et forment des cellules basales globulaires. Ces dernières sont les précurseurs des neurorécepteurs.

On retrouve également sous l'épithélium, les glandes de Bowman. Ces glandes sécrètent du mucus qui s'écoule *via* leur canal débouchant à la surface de l'EO.

1.2.1.2 Intégration du message olfactif : transduction d'un message chimique en un message électrique

1.2.1.2.1 Le mucus

Les molécules odorantes sont des molécules chimiques avec des propriétés physico-chimiques spécifiques. Lorsqu'elles pénètrent dans la cavité nasale, les molécules odorantes doivent

d'abord traverser le mucus. Effectivement, les récepteurs olfactifs sont séparés de l'air par une couche protectrice de sécrétion hydrophobique. Si les odeurs sont solubles dans le mucus, elles peuvent facilement le traverser. Si en revanche, elles ne le sont pas, elles doivent être prises en charge par des protéines spécifiques, les OBP (odorant binding protein, pour revue : Tegoni *et al.*, 2000). Ces protéines prennent en charge les molécules odorantes à l'interface air/mucus et les transportent vers les cils des neurorécepteurs olfactifs. Les OBP sont exprimées chez les mammifères terrestres et dans le système olfactif aérien du xénope (et non dans l'aquatique ; Millery *et al.*, 2005) mais ne le sont pas chez les poissons. Il est à noter que les protéines et enzymes présentes dans ce mucus semblent jouer un rôle important dans l'activation des récepteurs olfactifs et la perception olfactive (Nagashima et Touhara, 2010). Notamment, les OBP pourraient non seulement faciliter le transport des molécules odorantes mais pourraient par exemple permettre la dégradation des molécules odorantes après leur interaction avec les neurorécepteurs olfactifs.

Une fois la barrière de mucus passée, la première étape consiste en l'interaction entre une odeur (le ligand) et un récepteur situé sur les cils du neurorécepteur olfactif.

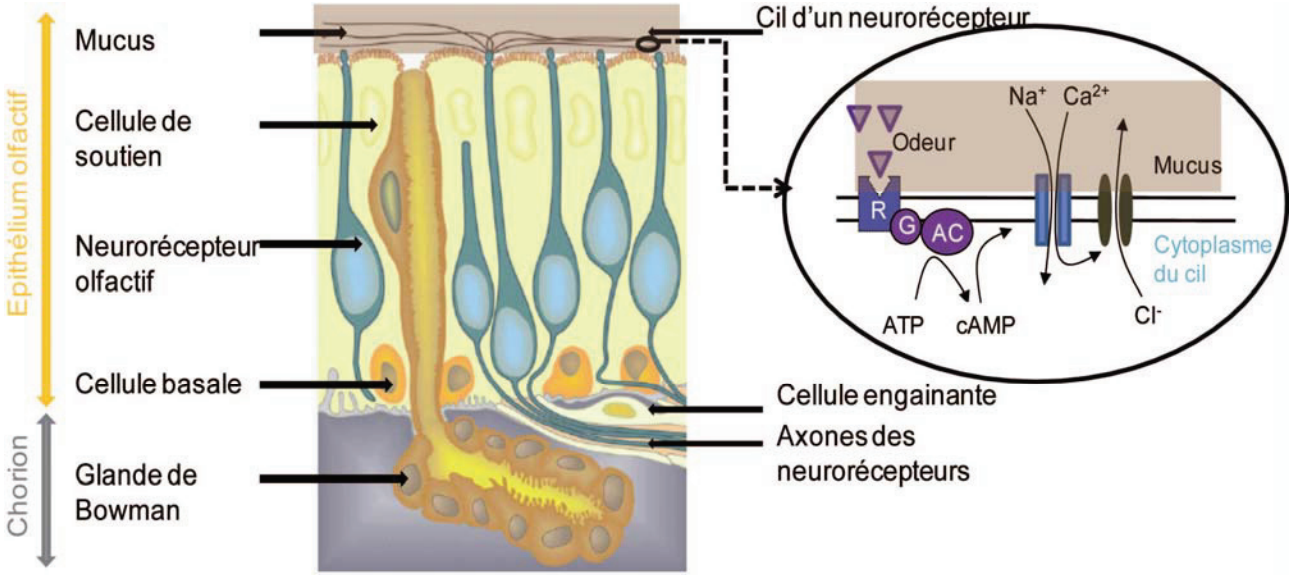


Figure 2: Anatomie et fonction de l'étage d'entrée de l'information olfactive. A gauche, représentation schématique de l'EO. L'EO repose sur le chorion. Les différents acteurs de cet étage sont représentés. Figure adaptée de Kleene, 2008. A droite, représentation de la transduction du message chimique en message électrique. Les molécules odorantes se fixent sur les protéines réceptrices aux odeurs (R) portées par les cils des neurorécepteurs. L'activation des protéines réceptrices conduit à l'activation en cascade d'une protéine G (G) puis à celle d'une adenylate cyclase (AC). Cette activation conduit à l'augmentation d'AMP cyclique (cAMP) permettant l'ouverture de différents canaux conduisant à une entrée de sodium (Na^+) et de calcium (Ca^{2+}). L'entrée de Ca^{2+} permet l'ouverture d'un canal chlore (Cl^-) et conduit à la dépolarisation de la cellule. D'après Kleene, 2008.

1.2.1.2.2 Transduction du message chimique en message électrique

En 1991, Buck et Axel (Buck et Axel, 1991), en utilisant des techniques de biochimie, ont identifié une super famille de gènes chez le rat. L'expression de ces gènes est restreinte à l'EO.

Cette famille multi-génique code pour environ un millier de protéines réceptrices aux odeurs. A ce jour, c'est la plus grande famille de gènes existante et les deux auteurs ont reçu en 2004, le prix Nobel de physiologie et médecine pour leurs travaux. Les protéines réceptrices possèdent 7 domaines transmembranaires sur lesquels viennent se fixer les odeurs. La cascade de réaction qui s'ensuit est désormais connue (Pour revue, Kleene, 2008).

Les protéines réceptrices (R sur la figure 2 à droite) activées sont couplées à une protéine G (G sur la figure 2) spécifique : G_{olf}. Cette dernière active une adenylyl cyclase (AC sur la figure 2) de type III, qui elle-même permet l'augmentation d'adénosine monophosphate cyclique (AMPc) dans le cil. Une concentration suffisante d'AMPc permet l'ouverture de deux canaux. Le premier est un canal CNG (cyclic nucleotide-gated). L'ouverture de ce canal, conduit un courant dépolarisant de cations, dont notamment du calcium. Si suffisamment de calcium est accumulé dans le cil, cela conduit alors à l'ouverture d'un second canal : un canal chlore calcium-dépendant. L'ouverture de ce canal conduit à la sortie d'ions chlore menant à la dépolarisation du neurorécepteur. Ces mouvements d'ions créent des dépolarisations locales qui se somment et qui dépolarisent, *via* la dendrite, le corps cellulaire du neurorécepteur. Lorsque le seuil d'excitabilité est franchi, les canaux voltage-dépendants du neurorécepteur sont activés et induisent un train de potentiels d'action. Les trains de potentiels d'action partent *via* l'axone du neurorécepteur vers le BO. Il existe également un autre second messager que l'AMPc : l'inositol tri-phosphate qui conduit également à la dépolarisation du neurorécepteur. Bien que moins connue, cette voie serait activée par certains acides aminés (Ma et Michel, 1998). Elle fait intervenir la phospholipase C et permet l'ouverture de canaux calciques engendrant la dépolarisation du neurorécepteur olfactif. Différents auteurs ont proposé que cette voie puisse interagir avec la voie de l'AMPc (Pour revue, Shipley et Ennis, 1996).

1.2.1.2.3 Une protéine réceptrice pour un neurorécepteur ?

La première étape clé de l'intégration du message olfactif est la présence de protéines réceptrices aux odeurs sur les neurorécepteurs olfactifs. Selon les études biochimiques, un neurorécepteur n'exprimerait qu'un seul gène de protéine réceptrice aux odeurs, cela conférerait au système olfactif une grande spécificité (Buck et Axel, 1991). Pour autant, les études électrophysiologiques ne vont pas tout à fait en ce sens. Duchamp-Viret *et al.* (1999) ont été les premiers à enregistrer l'activité extracellulaire des neurorécepteurs *in vivo* chez le mammifère. Ils ont montré que les neurorécepteurs de rats pouvaient répondre à des odeurs qualitativement différentes. De la même façon, la diversité des réponses des neurorécepteurs avait également été démontrée chez la grenouille (Sicard et Holley, 1984). Alors comment réconcilier les résultats électrophysiologiques et les données biochimiques ? En utilisant à la fois des outils biochimiques et l'imagerie calcique, Malnic *et al.* (1999) ont bien montré qu'un neurorécepteur olfactif n'exprimait qu'un seul gène de protéine réceptrice aux odeurs mais

également que ce neurorécepteur était sensible à différentes odeurs. Plus précisément, Araneda *et al.* (2000) ont déterminé le champ récepteur d'un neurorécepteur particulier (I7) en utilisant un panel de 90 molécules variant de groupes fonctionnels, de nombre de carbones, etc. Ces auteurs ont montré que le récepteur I7 était notamment très sensible au groupe fonctionnel des molécules (dans ce cas au groupement aldéhyde). Chaque récepteur détecte une propriété structurale d'une molécule. Ainsi, différentes molécules peuvent activer le même récepteur car ce dernier est sensible à l'une de leur fonction commune et une même molécule peut activer différents récepteurs car elle peut être composée de différentes fonctions. Chaque odeur active donc une combinaison spécifique de récepteurs et cette combinaison qui représente l'information olfactive (Malnic *et al.*, 1999).

1.2.1.3 Répartition topographique des protéines réceptrices aux odeurs et sensibilité différentielle de l'EO : Théorie des patterns inhérents

Historiquement, l'hypothèse de la répartition topographique des protéines réceptrices aux odeurs a été proposée suite à des études utilisant les enregistrements multi-unitaires des neurorécepteurs olfactifs et les électroolfactogrammes (EOG ; Mozell, 1964a,b ; 1966 ; Daval *et al.*, 1970 ; Mustaparta,1971). Nommée en référence à l'électrorétinogramme, l'EOG représente la sommation des potentiels générateurs engendrés par les mécanismes de transduction dans des milliers de neurorécepteurs olfactifs enregistrés à l'aide d'une électrode faiblement impédante (Ottoson, 1955, Pour revue : Scott et Scott-Johnson, 2002). Une stimulation odorante induit une onde lente monophasique. L'une des études pionnières est celle de Daval *et al.* (1970). Ces auteurs ont enregistré l'EOG en réponse à différentes odeurs chez la grenouille. Ils ont tout d'abord démontré qu'une même zone de l'EO pouvait répondre à différentes odeurs mais avec des amplitudes différentes. Cela pouvait être lié à l'efficacité de stimulation des molécules odorantes utilisées. Or ces auteurs ont démontré que l'amplitude de l'EOG à ces mêmes odeurs était différente en d'autres points de l'EO. Une odeur pouvait être très efficace pour activer une zone de l'EO et inefficace (ou moins efficace) pour en activer une autre. A la même époque, Kauer et Moulton (1974) enregistrèrent également l'EOG et montrèrent une sensibilité différentielle de l'EO en fonction de l'odeur et de la zone enregistrée. Moulton (1976) proposa que cette sensibilité différentielle de l'EO serait due à une distribution hétérogène des différents types de récepteurs olfactifs le long de l'EO, c'est ce qu'il a appelé les "patterns inhérents". En d'autres termes, un pattern inhérent de réponse est généré par la disposition des neurorécepteurs au sein de l'EO et n'est pas imposé par un composé extérieur. Ce pattern de réponse inhérent à l'EO a été plus tardivement décrit en utilisant d'autres techniques comme l'imagerie (Kent et Mozell, 1992). Notamment, ces auteurs ont montré qu'une odeur activait des zones spécifiques de l'EO. En utilisant une gamme plus large d'odeurs, l'équipe de Scott a pu

montrer que la sensibilité différentielle de l'EO était fonction des propriétés chimiques des odeurs (Ezeh *et al.*, 1995 ; Pour revue, Scott 2006).

La question de la répartition spatiale de la réponse olfactive a pris un nouveau sens depuis l'avènement de la biologie moléculaire. Les protéines réceptrices aux odeurs forment une grande famille. Ces protéines peuvent être regroupées en sous-famille dont chaque membre présente une séquence d'acides aminés presque identique (Ressler *et al.*, 1993). En utilisant des techniques d'hybridation *in situ,* différents auteurs ont pu montrer, chez le rat (Vassar *et al.*, 1993; Strotmann *et al.*, 1994) et la souris (Nef *et al.*, 1992 ; Ressler *et al.*, 1993), que l'expression des gènes des protéines réceptrices aux odeurs était organisée de façon topographique[1]. Les membres d'une même sous famille sont exprimés dans une même zone de la cavité nasale. Les auteurs ont pu délimiter 4 grandes zones (Fig. 3), zones 1 à 4, qui ne sont pas « purement » délimitées mais chevauchantes. Les zones sont définies selon les axes médio-latéral et dorso-ventral. En revanche, au sein de chaque zone, les récepteurs sont exprimés de façon aléatoire.

D'un point de vue phylogénétique, les protéines réceptrices aux odeurs ont pu être groupées en deux grandes classes (Freitag *et al.*, 1995):

- La classe I, issue phylogénétiquement des récepteurs de poissons.
- La classe II, appartenant aux familles des mammifères.

La classe I possède un certain nombre de sous-familles mais avec des séquences géniques très proches alors que la classe II possède beaucoup plus de sous-familles avec une diversité plus importante au niveau génique (Freitag *et al.*, 1995). Chez le xénope, ces deux classes de récepteurs sont réparties de façon très spécifique dans la cavité nasale, la classe I se plaçant au niveau de la chambre olfactive latérale et la classe II au niveau de la chambre olfactive médiale. (Mezler *et al.*, 2001 b). Ces deux classes de récepteurs ne présentent pas la même sensibilité aux odeurs. Les récepteurs de classe I répondent de façon préférentielle aux molécules solubles (Mezler *et al.*, 2001 a). Ceci semble tout à fait logique, puisque ces récepteurs sont hérités de la classe phylogénétique des poissons. Et au vu de leur milieu naturel, ces derniers ne rencontrent que des molécules sous forme soluble. Les récepteurs de classe II répondent à des composés hydrophobiques. Chez la souris, les gènes de protéines réceptrices aux odeurs peuvent également être regroupés en classes I et II (Zhang et Firestein, 2002). Tout comme chez le xénope, les récepteurs de classe I et II ne sont pas topographiquement répartis de la même façon. Par exemple, le récepteur RA_{1C} appartenant à la classe I n'est localisé qu'au niveau dorsal de la cavité nasale (Raming *et al.*, 1998). De façon plus globale, Yoshihara et Mori (1997) ont montré que les récepteurs de classe I se retrouvent dans la zone 1 de l'EO, au niveau dorsal

[1] *Ces études ne concernent que les neurorécepteurs matures*

(Miyamichi *et al.*, 2005). Les récepteurs de classes II sont répartis de façon moins spécifique sur les autres zones 2-4.

En résumé, les protéines réceptrices aux odeurs ne sont pas réparties de façon anarchique dans la cavité nasale. On trouve 4 grandes zones au sein desquelles la sensibilité aux odeurs est différente. Notamment, la zone 1 dorsale répond de façon préférentielle aux composés solubles puisqu'ils expriment une majorité de récepteurs de classe I.

Il est évident que cette topographie n'est pas équivalente à celle retrouvée, par exemple, dans le système somato-sensoriel, puisque les zones sont chevauchantes et qu'au sein d'une zone les neurorécepteurs portant le même type de protéines sont distribués de façon aléatoire.

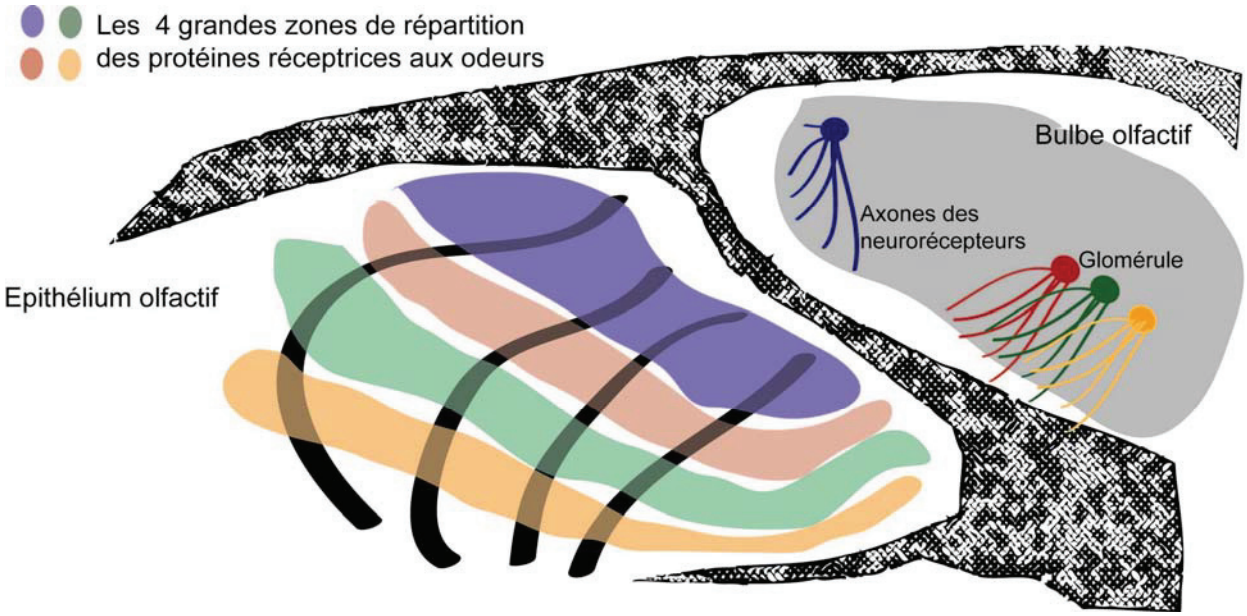


Figure 3 : Répartition en 4 grandes zones des protéines réceptrices aux odeurs et leur projection sur le BO. Sur la base des études de Ressler *et al.*, 1993 et Vassar *et al.*1993, une topographie grossière de la répartition des protéines réceptrices aux odeurs a pu être mise à jour. Ces 4 grandes zones sont représentées en bleu, rose, vert et orange. Ces différentes zones ne se projettent pas de façon anarchique sur le BO. La zone bleue (I, dorsale) se projette de façon majoritaire sur le BO dorsal. Les autres zones se projettent de façon préférentielle sur le BO ventral. Figure adaptée de Schoenfeld et Cleland, 2005.

1.2.1.4 Vers le Bulbe olfactif

Un neurorécepteur se projette avec une seule branche d'axone (de diamètre compris entre 0,1 et 0,4µm) sur le BO. Toute la collection d'axones émergeant de l'EO forme un fascicule : le nerf olfactif. Chaque nerf olfactif se projette sur le BO ipsilatéral en passant par la lame criblée de l'éthmoïde. Les axones des neurorécepteurs atteignent le BO et viennent faire synapse dans des neuropiles sphériques appelés glomérules, situés à la surface du BO. La couche glomérulaire forment la deuxième couche du BO, la première étant la couche des nerfs olfactifs.

Deux paramètres importants sont à prendre en considération concernant les projections épithélio-bulbaires :

- Des projections « zone à zone »
- Une forte convergence axonale.

Les projections épithélio-bulbaires s'organisent de façon spécifique et topographique. Les premières évidences proviennent d'études par lésion. En lésant des parties du BO, Le Gros Clark (Le Gros Clark, 1951) a pu montrer des dégénérescences zonales, relativement grossières, au niveau de l'EO. Bien qu'étant instructives, ces études par lésion sont peu précises. L'utilisation de marqueurs rétrogrades tel que la horse radish peroxydase ou encore l'isothyocyanate (respectivement, Astic et Saucier, 1986 ; Astic *et al.*, 1987 et Schoenfeld *et al.*, 1994) a permis de préciser la nature des projections épithélio-bulbaires. Ces études ont ainsi montré une relation entre la répartition spatiale des neurorécepteurs et leur projection au niveau bulbaire (Fig. 3). Plus récemment, en utilisant un modèle transgénique ainsi que des marquages rétrogrades, Miyamichi *et al.* (2005) ont démontré que l'arrangement dorso-ventral des glomérules était corrélé avec les domaines d'expression des protéines réceptrices le long de l'axe dorso-ventro-latéral de l'EO mais pas avec ceux de l'axe antéro-postérieur. A l'aide de marqueur spécifique des zones 1 (OCAM négatif) versus des zones 2-4 (OCAM positif), Yoshihara et Mori (1997) ont montré que les récepteurs de la zone 1 se projetaient majoritairement au niveau dorso-médial du BO. Les récepteurs des zones 2-4, quant à eux, se projettent plutôt au niveau ventral, en suivant également une répartition medio-latérale (Fig. 3 ; pour revue : Nagao *et al.*, 2002 ; Imai et Sakano, 2007). Il existe donc des projections « zone à zone » de l'EO au BO. Cependant, au sein des zones épithéliales, tous les neurorécepteurs proches ne convergent pas sur un même glomérule (Astic et Saucier, 1986 ; Schoenfeld *et al.*, 1994) et des neurorécepteurs éloignés, distribués de façon randomisée dans une même zone, peuvent converger sur un même glomérule (Kauer, 1981 ; Astic et Saucier, 1986 ; Astic *et al.*, 1987). Chaque glomérule reçoit des projections d'environ 20000 neurorécepteurs (Pour revue, Mori, 1995). Il a en fait été montré, *via* des techniques d'hybridation *in situ* et de modifications génétiques, que les neurones exprimant les mêmes protéines réceptrices aux odeurs convergent sur un ou quelques glomérules (Ressler *et al.*, 1994 ; Vassar *et al.*, 1994 ; Mombaerts *et al.,* 1996). Par exemple, les neurorécepteurs exprimant les protéines réceptrices F6, situés dans la même zone de l'EO mais distribués au sein de cette zone de façon randomisée, projettent sur un même glomérule au niveau de la partie ventro-médiale du BO (Vassar *et al.*, 1994).
Du fait de ces connexions épithélio-bulbaires spécifiques, les odeurs créent des cartes spatiales d'activation spécifiques au niveau du BO.

1.2.1.5 A l'interface EO-BO : les cartes d'activation glomérulaires

Si l'on assume les règles de zone à zone et de convergence glomérulaire, un glomérule devrait représenter un type de protéines réceptrices aux odeurs. Et l'arrangement spatial de l'activation de différents glomérules devrait représenter une carte d'activation spécifique de l'odeur. L'activation spatiale glomérulaire a été étudiée de façon extensive avec différentes techniques apportant chacune des informations spécifiques. Tout d'abord, les études pionnières ont été réalisées en utilisant un marqueur de la consommation de glucose : le 2-déoxyglucose (2-DG ; Jourdan *et al.*, 1980 ; Jourdan, 1982 ; Johnson *et al.*, 1999 ; Johnson et Leon, 2000). Les cartes spatiales induites par l'activation des gènes précoces ont également été utilisées (c-fos : Sallaz et Jourdan, 1993 ; zif268 : Inaki *et al.*, 2002). Enfin des études d'imagerie par colorant sensible au voltage (Kauer *et al.,* 1987) et d'imagerie intrinsèque (Rubin et Katz, 1999 ; Uchida *et al.*, 2000 ; Lin *et al.*, 2006) ont révélé des points fondamentaux des cartes d'activation bulbaires (de nombreuses revues sont dédiées à cette thématique : Mori, 1995 ; Nagao *et al.*, 2002 ; Khan *et al.*, 2010 ; Murthy, 2011 ; Fig. 4) :

1) La carte d'activation d'une odeur dans un BO est symétrique par rapport à la carte d'activation de l'autre bulbe.

2) Les cartes d'activation spatiales sont reproductibles à travers différents animaux.

3) Différentes odeurs activent des cartes spécifiques au niveau bulbaire. Et plus précisément, elles activent un nombre restreint de glomérules, comme prédit par la convergence axonale.

4) L'arrangement spatial de l'activation des glomérules est dépendant des caractéristiques physico-chimiques des molécules odorantes (Johnson *et al.*, 2002, Fig. 4). Par exemple, les acides gras activent plutôt la partie antéro-médiane (au niveau dorsal) et les alcools la partie latérale postérieure du BO (au niveau dorsal, Uchida *et al.*, 2000). Ensuite pour un même groupe fonctionnel, l'activation glomérulaire dépend également du nombre de carbones de la molécule odorante (Uchida *et al.*, 2000).

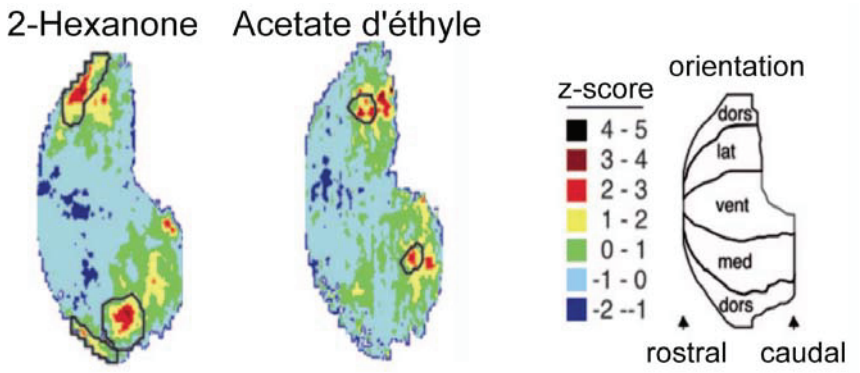


Figure 4 Les odeurs induisent des cartes spécifiques d'activité spatiale du BO. Carte spatiale d'activation avec le 2-DG en réponse à deux odeurs : la 2-hexanone (à gauche) et l'acétate d'éthyle (à droite). Le degré relatif de consommation du 2-DG est représenté par un code couleur basé sur le z-score. Plus les couleurs sont chaudes plus la consommation de 2-DG est grande. Les cartes spatiales représentent l'ensemble du bulbe selon les axes présentés tout à droite de l'image. Images tirées et adaptées d'après Johnson *et al.*, 2002.

1.2.2 Bulbe olfactif : premier relais central de l'information odorante

1.2.2.1 Anatomie

Le BO est une structure paire, sphérique, située à l'avant du télencéphale. Il est constitué de 6 couches organisées de façon concentrique (Fig. 5 ; Shepherd GM, 2004; The synaptic organization of the brain). De la périphérie (extérieur) vers le centre, on trouve différentes couches :

1.2.2.1.1 Couche des nerfs olfactifs

La couche des nerfs olfactifs est constituée par les axones des neurorécepteurs. Après avoir traversé la lame criblée de l'ethmoïde, les axones regroupés en faisceaux de plusieurs dizaines de fibres se réorganisent pour rejoindre des régions spécifiques du bulbe (*le code couleur des composants bulbaires reprend les couleurs utilisées dans la figure 5*).

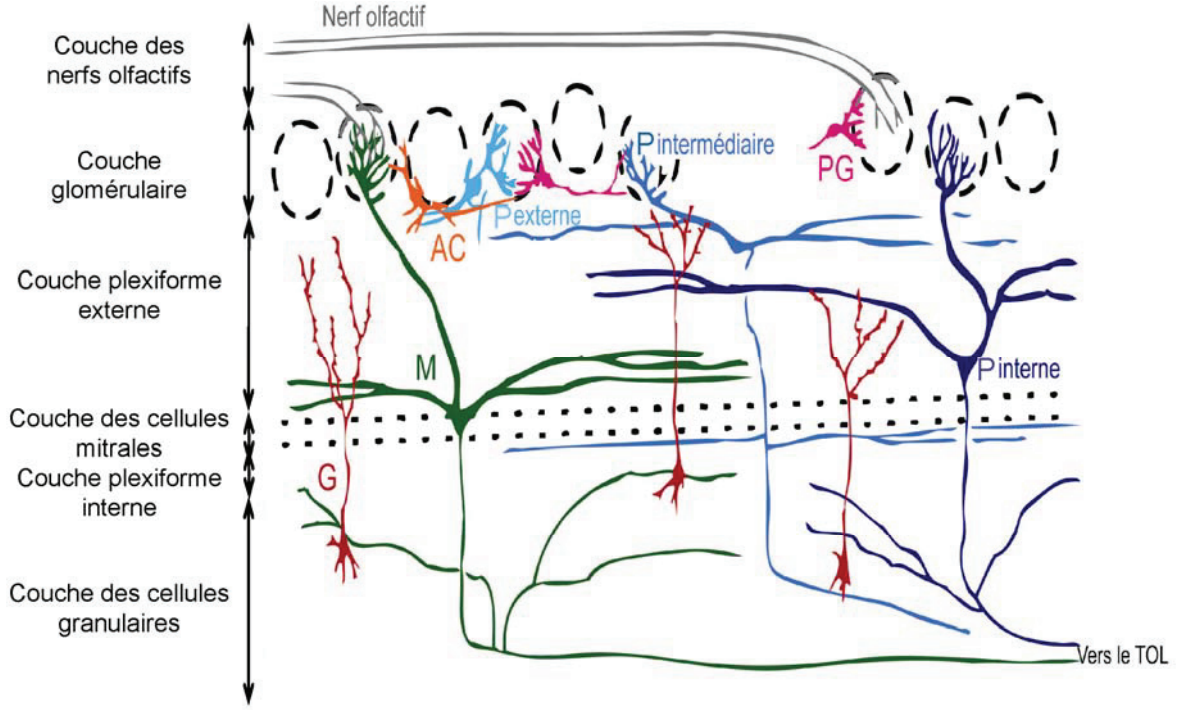


Figure 5 Organisation schématique du BO : les différentes couches et les cellules qui le composent. A gauche, les couches sont présentées, du haut vers le bas : couche des nerfs olfactifs composée des nerfs olfactifs ; couche glomérulaire regroupant les somas de différentes cellules. On retrouve les somas des cellules à axone court (AC en orange), des cellules périglomérulaires (PG en rose) et des cellules à panache externes (P externes en cyan). Après la couche glomérulaire, on retrouve la couche plexiforme externe où l'on peut trouver les somas des cellules à panache intermédiaires (P intermédiaires en bleu clair) et ceux des cellules à panache internes (P internes en bleu marine). Ensuite on a une couche fine composée des somas des cellules mitrales (M en vert), c'est la couche des cellules mitrales. En allant vers les profondeurs, on aura la couche plexiforme interne et enfin la couche des cellules granulaires composée des cellules granulaires (G, en rouge). Les axones des cellules P et M se dirigent ensuite vers leurs aires de projection *via* le tractus olfactif latéral (TOL). Adapté d'après Shepherd, The synaptic organization of the brain.

1.2.2.1.2 Couche glomérulaire

Chez le rat, chaque BO est constitué d'environ 4000 glomérules (Royet *et al.*, 1998 ; environ 2000 pour la souris, Royet *et al.*, 1988). Ce sont des structures sphériques de 100 à 200 µm de diamètre (Pinching et Powell, 1971b ; Royet *et al.*, 1988) isolées les unes des autres par un important réseau astrocytaire. Le glomérule est une zone fermée puisque les corps cellulaires des cellules juxta-glomérulaires (cellules périglomérulaires, cellules à axone court et cellules à panache externes) et astrocytes forment une barrière physique à la diffusion des neurotransmetteurs (De Saint Jan et Westbrook, 2005).

Les types neuronaux formant les glomérules ont été extensivement décrits par Cajal (1911) puis par Pinching et Powell (1971a,b,c) grâce à des imprégnations de Golgi et des marquages de Nissl.
Au niveau glomérulaire, on retrouve les somas de certaines cellules à panache (P). Les cellules P ont été, sur la base de la localisation de leur soma et de leurs prolongements dendritiques, regroupées en 3 classes (nous reviendrons dans la partie suivante sur cette classification ; Macrides et Schneider, 1982). Dans la couche glomérulaire, on retrouve uniquement les somas des cellules à panache externes (P externes). De forme fusiforme ou ovoïde, on les retrouve, plus précisément, dans les zones péri-glomérulaires profondes, à la lisière de la couche plexiforme externe. On retrouve aussi des somas de cellules P externes en superficie de la couche plexiforme externe. Les cellules P externes ont un soma de diamètre assez large (10-15µm). Elles présentent une dendrite primaire large qui s'arborise de façon importante dans un glomérule (Ennis *et al.*, 2007) et ne présentent que rarement des dendrites secondaires.

Dans la couche glomérulaire, on retrouve également les corps cellulaires des interneurones locaux. Tout d'abord, les cellules périglomérulaires (PG) qui sont des cellules sphériques ou ovoïdes, avec un soma d'un diamètre compris entre 5 et 8µm (Pinching et Powell, 1971a,b,c). Les cellules PG présentent une arborisation dendritique touffue au sein d'un glomérule (généralement dans une seule zone du glomérule). Les branches dendritiques des cellules PG se mélangent avec les terminaisons axonales des NR et les dendrites des neurones principaux (cellules Mitrales, M et P). Les axones des cellules PG peuvent s'étendre latéralement jusqu'à 3 ou 4 glomérules (Pinching et Powell, 1972b). Certaines cellules PG ne présentent cependant pas d'axone (Kosaka et Kosaka, 2011). Les dendrites et axones de cellules PG restent confinés à la couche glomérulaire (Schneider et Macrides, 1978). Il faut noter que les cellules PG ne forment pas un ensemble homogène. Il existe différentes classes de PG (Toida *et al.*, 1998). Cette classification est basée à la fois sur l'expression de protéines (par exemple, GABA, dopamine ou encore calbindine) mais également sur l'arborisation dendritique de ces cellules au sein du glomérule. Effectivement, certaines cellules PG n'arborisent que dans des zones glomérulaires

où les terminaisons du nerf olfactif sont présentes et d'autres où les terminaisons du nerf olfactif sont absentes (Toida *et al.*, 2000 ; Kosaka et Kosaka, 2011).
Au sein de la couche glomérulaire, on retrouve également les cellules à axones courts (AC). Les cellules AC présentent un large soma (8-12 µm), plus irrégulier que celui des cellules PG (Pinching et Powell, 1971a,b,c). Les cellules AC possèdent un arbre dendritique peu ramifié (2 à 7 dendrites, Schneider et Macrides, 1978). En revanche, à l'inverse de ce qu'indique leur nom, elles possèdent un axone long pouvant s'étendre au-delà de plusieurs glomérules et se prolonger dans différentes couches du bulbe (Schneider et Macrides, 1978).

1.2.2.1.3 Couche plexiforme externe

La couche plexiforme externe est la zone de passage et de contact entre les dendrites secondaires des cellules principales et des interneurones granulaires.
Dans cette couche, on trouve les somas des cellules P. Ces cellules P sont classées en 3 grandes catégories d'après la localisation de leur soma. On retrouve tout d'abord les cellules P externes, décrites précédemment, dont les somas sont à la fois dans la couche glomérulaire profonde et plexiforme externe superficielle (dans le 1/3 superficiel). On trouve ensuite les cellules P intermédiaires et internes (Marcrides et Schneider, 1982) dont les somas sont exclusivement localisés dans la couche plexiforme externe. De la partie la plus superficielle à la plus profonde, les somas des cellules P intermédiaires sont localisés au 2/3 de la couche plexiforme externe et ceux des cellules P internes (ou profondes), en superficie de la couche des mitrales. Les cellules P se distinguent également entre elles de par leurs zones de projection (voir paragraphe 1.2.2.2). Quelle que soit la localisation de leur soma, les cellules P possèdent des dendrites latérales plus courtes que celles des cellules M (Pinching et Powell, 1971a).
De façon importante, la couche plexiforme externe ne contient pas seulement les somas des cellules P mais aussi, et surtout, elle est le lieu de contacts synaptiques importants entre les dendrites secondaires des cellules M/P et les dendrites des cellules granulaires (Price et Powell, 1970a,c). Effectivement, les dendrites secondaires et primaires des cellules M passent à travers la couche plexiforme externe. Les dendrites secondaires des cellules M s'étendent parallèlement à la couche des cellules M, dans la couche plexiforme externe (Fig. 5 ; Mori *et al.*, 1983). Les contacts entre les dendrites secondaires des cellules M/P et les dendrites des cellules granulaires sont majoritairement des synapses réciproques (Rall *et al.*, 1966).

1.2.2.1.4 Couche des cellules mitrales

Les cellules mitrales (M) sont les principaux neurones relais du BO. La couche des cellules M est une monocouche fine contenant les somas des cellules M. Ces derniers sont les plus larges du BO (20µm de diamètre transverse et 30µm de diamètre vertical ; Price et Powell, 1970a). Il faut distinguer 3 grands compartiments au niveau des cellules M. Le premier est l'arborisation

élaborée et importante de la dendrite primaire qui se termine dans un seul glomérule et contacte les différents neurones présents (Price et Powell, 1970a). La deuxième portion constitue les prolongements des dendrites latérales (ou secondaires) dans la couche plexiforme externe et les synapses formées avec les cellules granulaires (Mori *et al.*, 1983). Enfin le troisième compartiment est représenté par l'axone. On peut retrouver deux grandes classes de cellules M en fonction de l'organisation de leurs dendrites secondaires et de la collatéralisation de leur axone (Orona *et al.*, 1984). Ainsi le type I présente de nombreux branchements des dendrites secondaires dans la couche plexiforme externe profonde et peu de collatérales d'axone. Le type II quant à lui, présente des dendrites secondaires dans les régions intermédiaires de la couche plexiforme externe ainsi que de nombreuses collatérales d'axone dans la couche plexiforme interne.

1.2.2.1.5 Couche plexiforme interne

Cette couche très fine, et quasiment dépourvue de corps cellulaires, contient les collatérales d'axones des cellules P et M ainsi que des dendrites des cellules granulaires (Price et Powell, 1970c).

1.2.2.1.6 Couche des cellules granulaires

La couche granulaire est la couche la plus profonde du BO et est celle qui contient le plus grand nombre de cellules. La couche granulaire contient les corps cellulaires des cellules granulaires (G) qui sont des interneurones inhibiteurs GABAergiques (Ribak *et al.*, 1977). Ces cellules ont été initialement décrites par Golgi mais aussi Cajal (Cajal, 1911). Ces deux auteurs ont décrit les cellules G comme étant dépourvues d'axone et dont les dendrites s'étendent radialement dans la couche plexiforme externe (Price et Powell, 1970b ; Pour revue, Shepherd *et al.*, 2007). Dans cette grande catégorie des cellules G, Schneider et Macrides (1978), ont pu décrire différents sous-types sur la base de la localisation de leur soma et de leur arborisation dendritique (Orona *et al.*, 1983). Ainsi on retrouvera des groupes de cellules G qui présentent des dendrites à tous les niveaux de la couche plexiforme externe, d'autres seulement dans la partie inférieure et d'autres partout sauf dans la partie inférieure (Mori *et al.*, 1983).

1.2.2.2 La sortie du message olfactif du BO vers d'autres contrées : les projections centripètes

Les axones des deux classes de neurones de projection, cellules M et cellules P, se regroupent pour former le tractus olfactif latéral (TOL). Chacune de ces deux classes a des zones de projections particulières. Par rapport aux autres modalités sensorielles, l'organisation anatomique des voies olfactives est unique car l'information en provenance de la périphérie ne relaye pas au niveau du thalamus avant d'atteindre le cortex. Dans un premier temps, nous

allons décrire l'ensemble des cibles de projection du BO puis nous verrons les différences entre cellules M et cellules P.

Le traçage des voies de transfert de l'information olfactive a commencé à beaucoup se développer dans les années 70 avec l'utilisation de marqueurs rétrogrades et antérogrades. Les études de projection du BO ont connu un regain d'intérêt en 2010-2012 grâce à l'utilisation de marqueurs viraux génétiques transynaptiques. Ces différentes études ont pu mettre en avant que le BO se projette de façon massive sur le cortex piriforme, *via* le TOL (Haberly et Price, 1977 ; Scott, 1981 ; Nagayama *et al.*, 2010). De par sa taille, le cortex piriforme constitue la principale structure olfactive corticale (Pour revue : Price, 1987). Il s'agit d'un paléocortex comprenant 3 couches histologiques (I, II et III ; Shepherd, 2011). C'est au niveau de la couche Ia (superficielle) qu'arrivent les afférences en provenance du BO qui forment des synapses excitatrices avec les dendrites apicales des cellules pyramidales dont les corps cellulaires se trouvent majoritairement dans la couche II (Price, 1987). Les projections du BO vers le cortex ne sont pas des projections topographiques (Haberly et Price, 1977 ; Scott, 1981 ; Schneider et Scott, 1983). Une petite zone bulbaire peut se projeter de façon très diffuse sur l'ensemble du cortex olfactif (Buonviso *et al.*, 1991). De la même façon, les afférences d'une zone discrète du cortex olfactif peuvent provenir d'un ensemble diffus de cellules M (Sosulski *et al.*, 2011). Cette notion doit tout de même être affinée. Effectivement, très récemment, Igarashi *et al.* (2012) ont montré que les projections des cellules M sur le cortex piriforme formaient des projections diffuses, confirmant les études précédentes mais les cellules P, elles, semblent se projeter de façon plus groupée, en zones, sur le cortex piriforme. C'est une première différence entre cellules M et cellules P. Les axones des cellules pyramidales du cortex piriforme se projettent ensuite sur le thalamus, le néocortex, l'hypothalamus latéral, ou encore le cortex amygdalien (Fig. 6).

Les axones des cellules M/P atteignent également le noyau olfactif antérieur, le tubercule oflactif, l'amygdale corticale (en particulier dans le noyau cortical latéro-postérieur en formant des zones restreintes denses) et le cortex entorhinal latéral (Price et Powell, 1971 ; Haberly et Price, 1977 ; Scott, 1981 ; Sosulski *et al.*, 2011 ; Fig. 6 et Fig. 7). *Via* sa projection sur le cortex entorhinal latéral, le BO peut activer le gyrus dente de l'hippocampe (Wilson et Steward, 1978). Les grandes voies de projection du BO sont schématisées dans la figure 6.

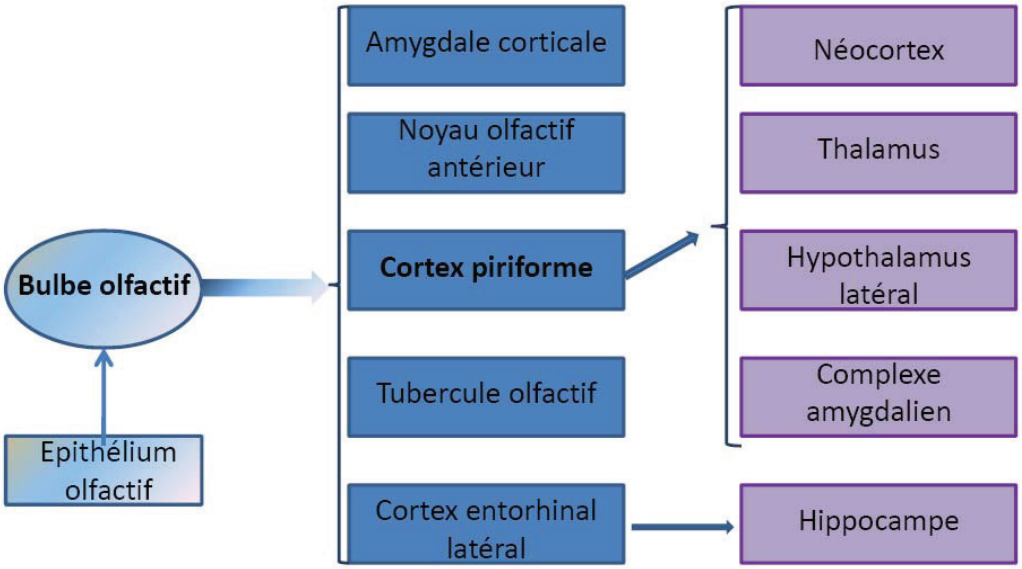


Figure 6 Représentation schématique des principales aires de projection du BO. En bleu, on aura les projections directes du BO et en violet, les indirectes. Par exemple, le BO se projette directement sur le cortex entorhinal latéral et indirectement sur l'hippocampe *via* le cortex entorhinal latéral.

Ceci est une vue globale des projections. Cependant, les cellules M et les différentes classes de cellules P possèdent des cibles de projection quelque peu différentes. Cela a tout d'abord été proposé grâce à des études de marquage avec la horse radish peroxydase et des études électrophysiologiques (Haberly et Price, 1977 ; Schneider et Scott, 1983; Scott, 1981). La conclusion de ces études a été affinée et validée par de récents travaux (Fig. 7 ; Ghosh *et al.*, 2011 ; Igarashi *et al.*, 2012). Ainsi, les cellules P externes se projettent de façon préférentielle sur le tubercule olfactif. Les cellules P intermédiaires, elles, se projettent plutôt sur le noyau olfactif antérieur et le cortex piriforme antérieur. Les cellules P internes connectent le noyau olfactif antérieur ainsi que le cortex piriforme antérieur et postérieur. Certaines cellules P, notamment externes (Schoenfeld *et al.*, 1985 ; Liu et Shipley, 1994) mais également intermédiaires et internes peuvent présenter des projections symétriques en miroir intra-bulbaires alors que les cellules M n'en présentent pas (Igarashi *et al.*, 2012). Il est à noter qu'Allison (1953) a montré que les axones des cellules P peuvent aussi passer par la commissure antérieure pour contacter le bulbe contro-latéral.

Les cellules M contactent, quant à elles, le tubercule olfactif, le noyau olfactif antérieur, le cortex entorhinal, l'amygdale et majoritairement le cortex piriforme antérieur et postérieur (Fig. 7 ; Schneider et Scott, 1983).

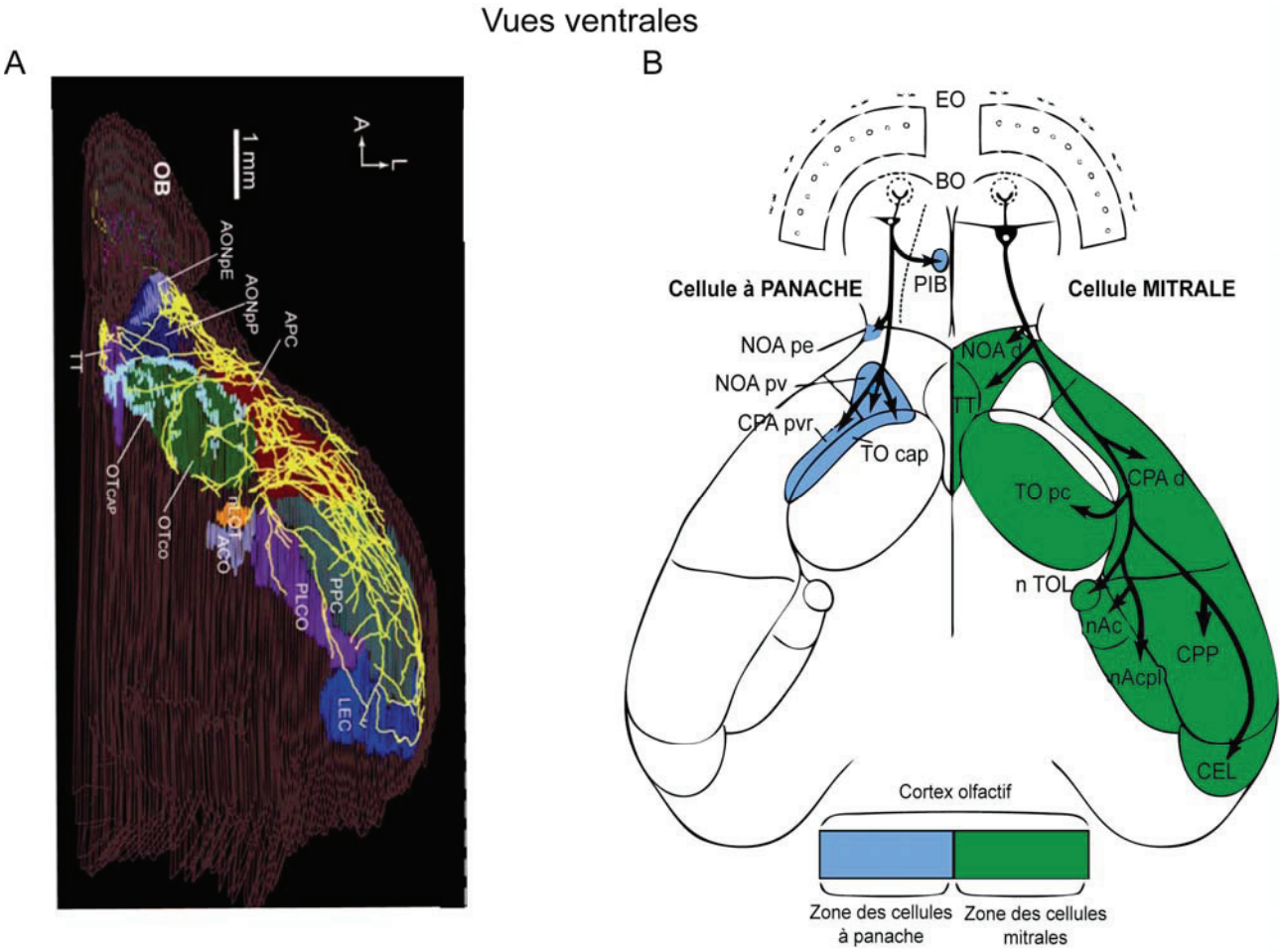


Figure 7 Projections des cellules M et P. A) Reconstruction en 3 dimensions des projections d'une cellule M. Vue ventrale des projections de cette cellule (axones en jaune) dans différentes aires corticales. B) Représentation schématique des projections des cellules P (zones de projection en bleu) et des cellules M, à droite (zones de projection en vert). Les projections suggèrent deux voies différentes des cellules M et P. Du bas vers le haut en commençant par la partie gauche, abréviations : EO, épithélium olfactif ; BO, bulbe olfactif ; PIB, projections intra-bulbaire ; NOA pe, noyau olfactif antérieur partie externe ; NOA pv, noyau olfactif antérieur partie ventrale ; CPA pvr, cortex piriforme antérieur partie ventro-rostrale ; TO cap, tubercule olfactif partie haute ; NOA d, noyau olfactif partie dorsale ; TT, *tenia tecta* ; TO pc, tubercule olfactif partie corticale ; CPA d, cortex piriforme antérieur dorsal ; n TOL, noyaux du tractus olfactif latéral ; nAc, noyaux de l'amygdale corticale ; CPP, cortex piriforme postérieur ; nAcp, noyaux de l'amygdale corticale postéro-latérale ; CEL, cortex entorhinal latéral. Figures adaptées d'après Igarashi *et al.*, 2012.

1.2.2.3 Les projections centrifuges

De nombreuses fibres se projettent sur le BO en arrivant majoritairement du côté ipsi-latéral, en passant par le pédoncule olfactif à proximité du TOL (certaines des fibres centrifuges passent à l'intérieur du tractus ; Price et Powell, 1970d). Par des approches lésionnelles ou des marquages, différents auteurs ont noté que les fibres centrifuges atteignent à la fois la couche granulaire (Price et Powell, 1970d) mais également la couche glomérulaire au niveau majoritairement des cellules PG et très minoritairement des cellules M/P et SA (Pinching et Powell, 1972a). On peut distinguer deux grandes classes de projections : celles qui proviennent

des aires atteintes par le BO et qui sont glutamatergiques et celles qui proviennent des centres neuromodulateurs. Ainsi dans la première, on retrouve des projections massives du cortex piriforme (Price et Powell, 1970d ; Neville et Haberly, 2003), du noyau olfactif antérieur (Matsutani, 2010), de l'amygdale (Price et Powell, 1970d) et du cortex entorhinal (Pour revue : Shipley et Ennis, 1996). Dans la deuxième classe de projection, on retrouve les projections neuromodulatrices (Fig. 8) :

- Cholinergiques : provenant de la bande horizontale de Broca (Price et Powell, 1970d ; 1971) et se terminant au niveau de la couche plexiforme externe sur les cellules PG et P mais également au niveau de la couche des cellules granulaires (Shipley et Ennis, 1996).
- Noradrénergiques : provenant du *locus coeruleus* et se terminant majoritairement au niveau de la couche plexiforme interne et de la couche des cellules granulaires et minoritairement dans la couche plexiforme externe (Jahr et Nicoll, 1982a ; Jiang *et al.*, 1996) .
- Sérotoninergiques : provenant des noyaux dorsaux et médiaux du raphe (McLean et Shipley, 1987) avec une innervation importante de la couche glomérulaire.

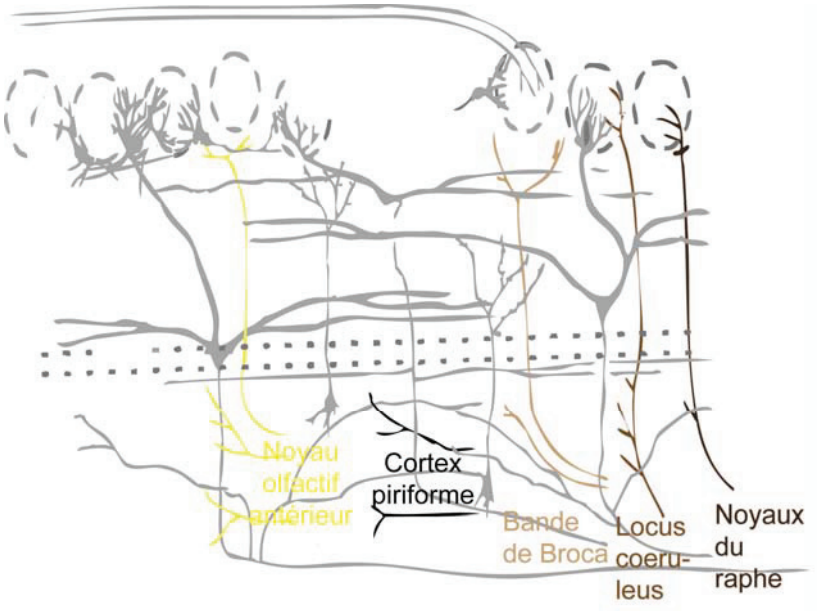


Figure 8 Représentation schématique des projections centrifuges glutamatergiques et neuromodulatrices. Les projections glutamatergiques proviennent majoritairement du noyau olfactif antérieur (en jaune) et du cortex piriforme (en noir). Les projections neuromodulatrices sont également représentées (gamme de marron), avec les projections cholinergiques (Bande de Broca), noradrénergiques (Locus coeruleus) et sérotoninergiques (Noyaux du raphé). Adapté de Shepherd GM, the synaptic organization of the brain, 2004.

Nous venons de voir l'anatomie et les zones de projections du BO. Le BO n'est pas un simple relais de l'information de la périphérie vers le cortex. Effectivement, le BO présente plusieurs niveaux d'intégration de l'information olfactive. Dans le prochain paragraphe, nous allons donc décrire ces différents niveaux.

1.2.3 Intégration du message olfactif au niveau bulbaire

Au sein du BO, l'information sensorielle est traitée et façonnée grâce à l'intervention de microcircuits. On retrouve deux grands niveaux d'intégration faisant intervenir les interneurones glomérulaires et les interneurones granulaires.

1.2.3.1 Premier niveau d'intégration : le glomérule

1.2.3.1.1 Réseau intra-glomérulaire

Les contacts synaptiques au sein du glomérule se font entre trois éléments:

* les axones des neurorécepteurs. Ces axones contactent toutes les terminaisons dendritiques des neurones de deuxième ordre (cellules M et P), des cellules PG (Pinching et Powell, 1971a,b) mais pas celles des cellules AC (Hayar *et al.*, 2004a).
* les dendrites des neurones de deuxième ordre (cellules M et cellules P). Un glomérule reçoit les dendrites d'une vingtaine de cellules M et d'une cinquantaine de cellules P (Allison, 1953 ; Shipley *et al.*, 1996).
* des terminaisons des interneurones locaux (cellules PG et AC). Les contacts entre PG et M/P forment des synapses réciproques (Pinching et Powell, 1971 a,b).

Excitation intra-glomérulaire

On retrouve deux grands types d'excitation synaptique au sein du glomérule 1) les excitations mono-synaptiques résultant d'un contact direct entre le nerf olfactif et l'élément post-synaptique (cellules M/P et 20% des cellules PG) et 2) les excitations poly-synaptiques résultant d'une première synapse entre le nerf olfactif et les cellules P externes et d'une seconde entre ces dernières et les cellules PG, AC et probablement certaines cellules M (Fig. 9 ; pour revue : Shipley et Ennis, 1996 ; Ennis *et al.*, 2007 ; Wachowiak et Shipley, 2006 ; De Saint Jan *et al.*, 2009 ; Gire *et al.*, 2012). Nous allons détailler ces différents contacts (Fig. 9).

Le nerf olfactif va tout d'abord contacter de façon mono-synaptique les cellules M/P. La transmission de l'information se fait *via* le glutamate qui active des récepteurs AMPA, kainate, NMDA et métabotropiques (mGlu ; Ennis *et al.*, 1996 ; Chen et Shepherd, 1997 ; Ennis *et al.*, 2007). Effectivement les réponses *in vitro* des cellules M/P aux stimulations orthodromiques des nerfs olfactifs sont diminuées ou abolies en présence d'antagoniste NMDA et non-NMDA spécifiques (AP5 et CNQX, respectivement). Le nerf olfactif contacte également certaines cellules PG, 20% d'entre elles, qui présentent alors une réponse mono-synaptique à la stimulation du nerf olfactif, portée par les récepteurs AMPA et NMDA (Bardoni *et al.*, 1996 ; Sassoé-Pognetto *et al.*, 2003 ; Hayar *et al.*, 2004a). Les 80% de réponses restant sont poly-synaptiques et

corroborent donc les études structurelles montrant que certaines cellules PG ne possèdent pas d'arborisation dendritique dans les zones des terminaisons axonales des NR (Toida *et al.*, 2000). Les réponses des cellules AC à la stimulation du nerf olfactif sont également poly-synaptiques. Au vu de travaux récents, il semblerait que l'activation des cellules PG et AC soit principalement médiée par les cellules P externes (Hayar *et al.*, 2004a). Ainsi, on a le schéma suivant : l'activation du nerf olfactif active, *via* des synapses glutamatergiques, les cellules P externes qui à leur tour activent à la fois des cellules PG et des AC, également par l'intermédiaire du glutamate. Les cellules P externes semblent donc être un intermédiaire majeur dans la transmission de l'information. D'ailleurs, certains auteurs ont présumé que les cellules P externes contacteraient en majorité le nerf olfactif et relaieraient seulement ensuite l'information aux cellules M (Gire *et al.*, 2012). Cela est lié au fait que la réponse des cellules P externes précède celle des cellules M aussi bien *in vitro* (De saint Jan *et al.*, 2009) qu'*in vivo* (Igarashi *et al.*, 2012). Ces données vont à l'encontre des données pionnières de microscopie électronique montrant des contacts synaptiques directs en cellules M et nerf olfactif (Pinching et Powell, 1971a). Alors comment résoudre cet apparent conflit ? Lorsque l'on stimule le nerf olfactif, si l'on enregistre la réponse des cellules M, on peut observer une réponse biphasique (De Saint Jan *et al.*, 2009). Il a été proposé que la 1ère phase de la réponse rapide serait médiée par un contact axo-dendritique rapide mono-synaptique des NR sur les cellules M. La 2ème phase de la réponse, plus tardive, elle, serait la résultante d'un contact dendro-dendritique provenant des cellules P externes (De Saint Jan *et al.*, 2009 ; Najac *et al.*, 2011). Cette dernière voie serait notamment empruntée lorsque l'entrée sensorielle est faible. En effet, il a été démontré que les cellules P externes avaient un seuil de réponse plus bas que celui des cellules M *in vitro* (De saint Jan *et al.*, 2009) ainsi qu'*in vivo* (Igarashi *et al.*, 2012).

En plus de l'excitation synaptique liée à l'entrée, les cellules M peuvent s'auto-exciter (Nicoll et Jahr, 1982), par le biais d'autorécepteurs AMPA et NMDA (Fig. 9 ; Schoppa et Westbrook, 2002).

Au sein de l'espace glomérulaire, on retrouve également d'autres phénomènes d'excitation qui se produisent grâce :

1) au spillover glutamatergique (Fig. 9). Il a été montré que l'émission d'un potentiel d'action (PA) dans une cellule M induisait des potentiels post-synaptique excitateurs dans une cellule M appartenant au même glomérule, ce processus étant glutamate-dépendant (Carlson *et al.*, 2000 ; Christie et Westbrook, 2006 ; De Saint Jan et Westbrook, 2007 ; Gire et Schoppa, 2009). Or anatomiquement, il ne semble pas exister de contacts synaptiques entre cellules M (Pinching et Powell, 1971a). Cette excitation serait donc liée à la diffusion du glutamate dans l'espace glomérulaire. Ce mécanisme permettrait la synchronisation et l'amplification de la réponse des cellules M (Buonviso *et al.*, 1992 ; Schoppa et Westbrook, 2001 ; Dhawale *et al.*, 2010) et des cellules P (Hayar *et al.*, 2005).

2) au couplage électrique (Fig. 9). Les cellules M/P possèdent notamment des connexines 45 (Zhang et Restrepo, 2003) et des connexines 36 (Schoppa et Westbrook, 2002). Schoppa et Westbrook (2002) en enregistrant des paires de cellules M appartenant à un même glomérule ont montré que le couplage entre ces cellules était aboli lorsqu'ils ajoutaient du carbenexolone (un bloqueur des jonctions communicantes ou serrées). De la même façon, il a été montré que l'excitation latérale des cellules M par des cellules M nécessitait des jonctions serrées (Christie et Westbrook, 2006).

Finalement, ce couplage glomérule-spécifique peut être important pour le codage puisqu'il peut permettre d'amplifier le signal d'entrée et d'atteindre plus facilement le seuil des neurones des aires post-bulbaires (Schoppa et westbrook, 2002).

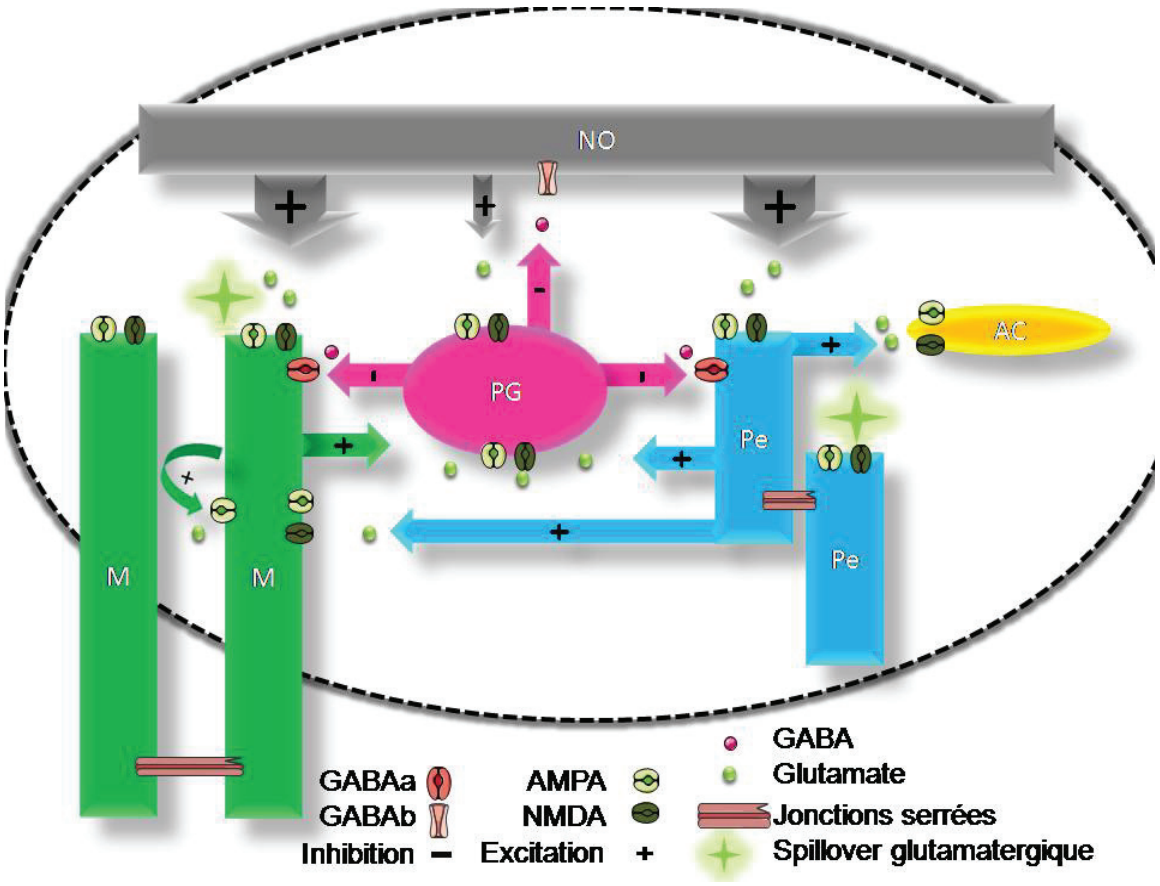


Figure 9 Représentation schématique du fonctionnement synaptique au niveau glomérulaire. En gris, on retrouve le nerf olfactif (NO) libérant du glutamate (ronds verts). Au sein du glomérule, on retrouve les dendrites primaires des cellules mitrales (M, en vert) et à panache (externes Pe, en bleu) ; les cellules périglomérulaires (PG en rose) et les cellules à axone court (AC, en orange). Les cellules M, P et PG reçoivent une excitation glutamatergique directe du NO avec des récepteurs AMPA et NMDA. Les cellules AC sont activées par le glutamate libéré par les cellules Pe et possèdent également des récepteurs AMPA et NMDA. Les cellules M peuvent s'auto-exciter via l'activation de récepteurs AMPA. Les différentes cellules peuvent également être excitées par le spillover glutamatergique (étoile verte) ou par l'intermédiaire de jonctions serrées entre cellules (en saumon). Les cellules PG activées libèrent du GABA (ronds roses) qui inhibe le NO *via* des récepteurs GABAb et les cellules M/P *via* des récepteurs GABAa.

Inhibition intra-glomérulaire

Les PG, une fois activées, inhibent à la fois les cellules M, P intermédiaires, internes (Gire et Schoppa, 2009 ; Murphy *et al.*, 2005) et externes (Fig. 9 ; Hayar *et al.*, 2004a ; 2005). Il existe très peu d'enregistrements *in vivo* des cellules PG mais Wellis et Scott (1990) ont démontré que la réponse des cellules PG à la stimulation du nerf olfactif résultait en un potentiel d'action suivi d'une longue dépolarisation. Cette dépolarisation survient au même moment que la suppression des potentiels d'action observée dans les cellules M/P. Ces jeux d'inhibition sont principalement portés par les récepteurs GABAa (Fig. 9). Le GABA libéré par une PG peut également affecter l'activité d'une PG proche par l'intermédiaire des récepteurs GABAa (Murphy *et al.,* 2005).
Un autre type d'inhibition synaptique a également été décrit : c'est l'inhibition pré-synaptique. Cette dernière a été décrite par Jahr et Nicoll (1981) sur des tranches de BO de grenouille. Les axones de NR portent des récepteurs GABAb et dopaminergiques par l'intermédiaire desquels l'inhibition se fait (Wachowiak et cohen, 1999 ; Palouzier-Paulignan *et al.*, 2002 ; Pirez et Wachowiak, 2008 ; pour revue :Wachowiak et Shipley, 2006 ; Linster et Cleland, 2009).

Les balances entre excitation et inhibition produites par les intervenants intra-glomérulaires modulent donc le fonctionnement des glomérules. Mais bien que les glomérules soient isolés par une barrière gliale, on retrouve également des interactions inter-glomérulaires.

1.2.3.1.2 Réseau inter-glomérulaire

L'acteur majeur qui prend part aux interactions entre glomérules voisins est la cellule PG. Pinching et Powell (1971a ; 1972b) ont mis en évidence que les dendrites d'une cellule PG arborisaient dans un glomérule et que son axone s'étendait et contactait les dendrites et somas des cellules M/ P et PG dans les glomérules voisins (de 3 à 4 glomérules plus loin). Comme décrit plus haut, les cellules PG sont des neurones GABAergiques. Par l'intermédiaire de ce neurotransmetteur, les PG, peuvent donc avoir deux rôles différents : 1) activer les glomérules voisins en inhibant les cellules PG et 2) inhiber les glomérules voisins, en inhibant les cellules M/P (Shepherd, 2004). L'inhibition peut aussi prendre un autre chemin plus indirect. Lorsqu'un glomérule est activé, les cellules AC sont activées. Elles activent alors, par l'intermédiaire du glutamate et de leur axone long, les cellules PG de glomérules adjacents (Aungst *et al.*, 2003).

1.2.3.2 Interactions mitrales-granules : le deuxième niveau d'intégration bulbaire

1.2.3.2.1 Interaction mitrales-granules : description

La couche plexiforme externe est une zone de contact entre les dendrites secondaires des cellules M/P et les dendrites des cellules granulaires. C'est là qu'intervient un deuxième niveau

d'intégration (Pour revue, Shepherd *et al.*, 2007). Le groupe de Shepherd dans les années 1960-1970 a révélé, grâce à l'étude des potentiels évoqués dans le BO par la stimulation antidromique des cellules M/P, l'existence d'une synapse dendro-dentrique asymétrique entre cellules M/P et G (Fig. 10A). Dans une première étude (Philipps *et al.*, 1963), les auteurs ont observé que la stimulation électrique des axones des cellules M provoquait une décharge de potentiels d'action, et que rapidement après ce volet d'excitation (environ 100ms), la cellule M était inhibée. Ils ont alors proposé que cette inhibition puisse être médiée par des interneurones bulbaires activés par ces mêmes cellules M. Dans une seconde étude, ces auteurs enregistraient les potentiels évoqués par la stimulation du TOL, pas à pas dans chaque couche bulbaire. Ils ont alors observé des réponses dont le pattern était corrélé à la position de l'électrode dans le bulbe (Fig. 10B). En utilisant à la fois un modèle et des données expérimentales Rall *et al.* (1966 ; Rall et Shepherd, 1968) purent expliquer cette observation. La forme du potentiel évoqué dans les différentes couches par la stimulation du TOL résulte d'une succession de différents événements que l'on peut décomposer en trois phases. Comme le montre la figure 10B, les phases I et II correspondent à l'activation des cellules M/P par la stimulation du TOL. Plus précisément, la phase I reflète l'entrée de courant au niveau des corps cellulaires des cellules M/P. L'activation se propage alors le long des dendrites générant une entrée massive de courant au niveau de l'arbre dendritique des cellules M/P. Cette entrée massive de courant dans l'arborisation dendritique induit une fuite de courant au niveau du corps cellulaire des cellules M/P, c'est le début de la phase II. L'entrée massive de courant dans les dendrites des cellules G provoque la sortie de courant au niveau de leur corps cellulaire. Enfin la phase III, la plus large, correspond à un flux de courant extracellulaire provenant de la couche granulaire sortant dans la couche plexiforme externe. Et effectivement, le début de la phase III correspond au niveau de l'activité unitaire des cellules M/P à l'initiation de l'inhibition. Cette démonstration ainsi que la microscopie électronique (Rall et Shepherd, 1968) ont révélé la présence d'une synapse dendro-dendritique entre cellules M/P et G. Ainsi les cellules M/P activées, activent les cellules G (Jahr et Nicoll, 1982b) qui en retour les inhibent.

L'activation de la granule est médiée par le glutamate (Pour revue, Shepherd *et al.,* 2007). Les cellules G portent des récepteurs NMDA et non NMDA (Fig. 11 ; Isaacson et Strowbridge, 1998 ; Schoppa *et al.*, 1998 ; Sassoé-Pognetto *et al.*, 2003). L'activation des récepteurs NMDA produit une dépolarisation de la granule. Cette dépolarisation permet alors d'activer des canaux voltage-dépendants, faisant ainsi entrer du calcium et déclenchant la libération du GABA (Halabisky *et al.*, 2000). Le GABA agit alors en retour sur les récepteurs GABAa (Yokoi *et al.*, 1995 ; Panzanelli *et al.*, 2004) des cellules M/P provoquant ainsi leur inhibition.

Via leurs synapses réciproques, les cellules G peuvent jouer sur l'activation des cellules M/P proches mais pas seulement (Mouret *et al.*, 2009). Grâce à son important réseau dendritique, une cellule G activée par une cellule M/P peut libérer du GABA sur d'autres dendrites latérales

et ainsi inhiber des cellules M/P plus lointaines : c'est l'inhibition latérale (Fig. 11 ; Isaacson et Strowbridge, 1998). Ceci permettrait d'augmenter le contraste entre différentes zones activées ainsi que la spécificité de la réponse aux odeurs des cellules M/P (Yokoi *et al.*, 1995).

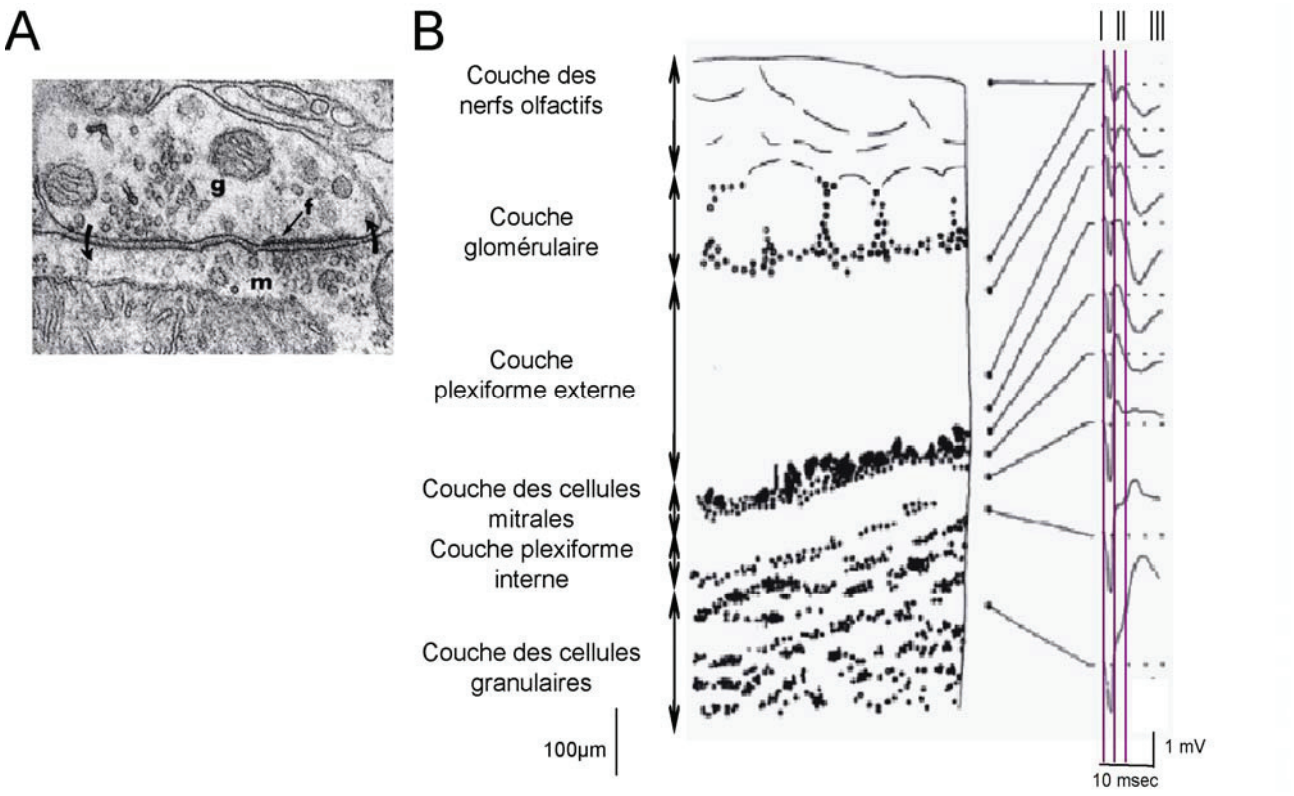


Figure 10: A- Photographie de microscopie électronique d'une synapse réciproque dendro-dendritique entre une cellule granulaire (g) et une cellule mitrale (m). D'après Philipps *et al.*, 1963 et Rall et Shepherd, 1968. B- Dessin d'une coupe histologique de BO à gauche. A droite, sont représentés les potentiels évoqués par la stimulation du tractus olfactif latéral. Chaque point noir représente la zone enregistrée. Les potentiels évoqués enregistrés dans chacune des couches peuvent être découpés en trois grandes phases : I, II et III délimitées par les traits violets. On voit très nettement des changements de polarités associés à chacune des couches. Figure adaptée de Rall et Shepherd, 1968.

Les retours corticaux (énumérés dans la partie 1.2.2.3) modulent la boucle excitation-inhibition. Par exemple les projections excitatrices provenant du cortex piriforme et activant les cellules G jouent sur l'inhibition dendro-dendritique des cellules M/P (Strowbridge, 2009). Les projections cholinergiques modulent également la synapse inhibitrice dendro-dendritique en activant les cellules G (Elaagouby et Gervais, 1992 ; Tsuno *et al.*, 2008). Au contraire, le système noradrénergique diminuerait la transmission GABAergique (Pandipati *et al.*, 2010). Mais cet effet désinhibiteur n'a été testé qu'à une seule concentration de noradrénaline, et différents auteurs supposent des effets différents à différentes concentrations.

A côté de cette boucle d'excitation-inhibition, on retrouve également des processus d' « auto-modulation » au niveau des dendrites des cellules M/P et des cellules G. Ainsi, les cellules M peuvent s'auto-exciter par le biais d'auto-récepteurs glutamatergiques (Fig. 11 ; Nicoll et Jahr,

1982). Pour diminuer l'inhibition des cellules M/P, les granules peuvent s'auto-inhiber grâce à la présence d'auto-récepteurs GABAb sur leur membrane (Isaacson et Vitten, 2003).

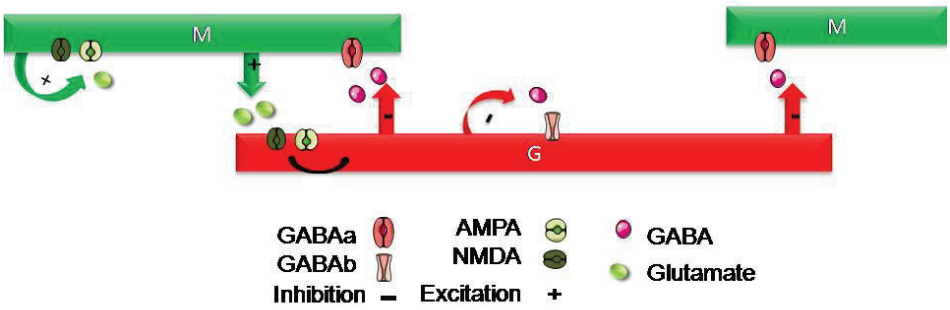


Figure 11 Représentation schématique des interactions synaptiques entre cellules mitrales (M, en vert) et cellules granulaires (G, en rouge). Les traits verts représentent les dendrites secondaires des cellules M. Les cellules M activées libèrent du glutamate qui permet l'activation des cellules granulaires mais également l'auto-excitation de la mitrale via des récepteurs AMPA et NMDA. L'activation des récepteurs AMPA et NMDA des cellules G permet soit la libération directe de GABA soit la dépolarisation de la cellule qui permet la libération du GABA. Ce dernier va soit inhiber les cellules M proches ou lointaines via des récepteurs GABAa soit s'auto-inhiber *via* des récepteurs GABAb.

Finalement, par le biais des niveaux d'inhibition, le BO peut moduler l'information transmise aux aires supérieures et notamment au cortex piriforme.

1.2.3.2.2 Interactions mitrales-granules : Genèse des rythmes rapides

Edgar Douglas Adrian (1942, 1st Baron Adrian-30 Nov. 1889 – 4 Aout 1977-lauréat du Prix Nobel de Physiologie en 1932) décrivit, pour la première fois, dans le système olfactif « de courts "paquets" d'ondes de potentiel … dont la fréquence varie entre 15 et 45 coups par seconde ». Ces « ondes induites » par une stimulation odorante sont désormais plus connues sous l'appellation d'oscillations du potentiel de champ local (PCL). Le PCL est la résultante des courants locaux générés au niveau des synapses (potentiels post synaptique excitateurs- et potentiels post synaptique inhibiteurs).

Gamma (35-90 Hz)

Adrian (1942, 1950) enregistra, en réponse à des stimulations odorantes, le PCL chez un hérisson anesthésié. Il nota la présence de bouffées oscillatoires dont la fréquence était comprise entre 50 et 60 Hz. Le terme gamma, caractérisant ces bouffées comprises entre 35 et 90 Hz, est apparu dans les années 1980 (Bressler et Freeman, 1980), en référence aux oscillations décrites par Hans Berger.

En ce qui concerne l'origine de l'oscillation gamma, Rall *et al.* (1966) ont, sur la base de leur travail théorique, proposé que la boucle mitrale-granule puisse être à l'origine de ces phénomènes rythmiques. Freeman reprit (1974) cette hypothèse en partant du principe que ces oscillations étaient générées par les interactions synaptiques entre neurones excitateurs (E) et

neurones inhibiteurs (I). Ainsi chaque cycle d'oscillation est composé de 4 étapes : 1) l'excitation du neurone E, 2) excitation du neurone I, 3) inhibition du neurone E et enfin 4) inhibition du neurone I, conduisant à la ré–excitation du neurone E et ainsi à un autre cycle d'oscillation. Dans le BO, la boucle mitrale-granule est l'élément qui pourrait générer les oscillations. Freeman (1974) calcula différentes constantes de temps des cellules M et G, et arriva au compte que la somme des 4 étapes énumérées ci-dessus était d'environ 24ms soit en terme fréquentiel environ 40Hz. Ces travaux théoriques donnent donc des résultats qui sont compatibles avec les données expérimentales.

Si la boucle mitrale-granule est à l'origine du rythme gamma, cela veut dire que le mécanisme générateur est intrinsèque au BO. Des études ont démontré qu'en supprimant la connexion entre le BO et le cortex soit de façon réversible, par le cryoblocage (Gray et Skinner, 1988b) ou la lidocaine (Martin *et al.*, 2006), soit de façon irréversible (Neville et Haberly, 2003), le rythme gamma persistait dans le BO. De façon intéressante, Gray et Skinner (1988b) ainsi que Martin *et al.*, (2006) ont montré que le rythme gamma persistait mais augmentait en terme de puissance et diminuait en fréquence. Une modification des caractéristiques de l'oscillation gamma semble logique puisque les retours corticaux contactent et modulent la boucle mitrale-granule.

Une autre preuve que le rythme gamma est généré de façon intrinsèque au bulbe par la boucle mitrale-granule a été apportée par Lagier *et al.* (2004). Ces auteurs ont montré que l'oscillation gamma pouvait être générée sur tranche de BO en stimulant le nerf olfactif. Le rythme gamma est donc généré de façon intrinsèque au BO par la boucle mitrale-granule.

Beta (10-30 Hz)

Le rythme beta a été moins étudié que le rythme gamma. Il a pour la première fois été décrit par Becker et Freeman (1968). Bressler (1984) l'a ensuite nommé 'oscillation secondaire'. Ce rythme est présent à la fois dans le bulbe et le cortex piriforme. Bressler a alors supposé que cette oscillation beta représenterait un signal de retour du cortex piriforme vers le bulbe. Plus récemment, grâce à des analyses de densités de courants, Neville et Haberly (2003) ont proposé que le rythme beta soit généré par l'interaction mitrale-granule et nécessiterait la participation du cortex piriforme. En déconnectant de façon réversible (Martin *et al.*, 2006) ou irréversible (Neville et Haberly, 2003) la liaison du BO au cortex, il a été montré que l'oscillation beta disparaissait dans le BO (Neville et Haberly, 2003 ; Martin *et al.*, 2006). La genèse du rythme beta fait donc intervenir la boucle mitrale-granule mais nécessite que la connexion bulbo-corticale soit intacte.

1.3 L'inextricable relation olfaction - respiration : « Car l'odeur était sœur de la respiration… » *(P. Suskind, extrait de « Le Parfum »)*

La dynamique du stimulus olfactif est extrêmement importante. Cette dynamique est principalement liée au mode d'échantillonnage des odeurs, lui-même directement dépendant de la respiration.

Les flux d'air créés par les mouvements respiratoires transportent les molécules odorantes de l'environnement à la cavité nasale par l'inspiration et de la cavité nasale à l'environnement par l'expiration. L'inspiration produit donc une perception ortho-nasale, l'expiration une perception rétro-nasale. La perception rétro-nasale intervient principalement lorsque l'on ingère un aliment car des enzymes buccales dégradent et libèrent les molécules présentes dans l'aliment. A chaque expiration, une partie de ces molécules est dirigée vers la cavité nasale en passant par l'arrière du palais. Au cours de ma thèse, nous nous sommes uniquement intéressées à la perception ortho-nasale.

Alors que l'on parle de respiration, ou acte respiratoire, chez un animal anesthésié, on préfèrera employer le terme de flairage chez l'animal en comportement. Au cours de ce manuscrit, je parlerai indifféremment de flairage ou de respiration. Il faut également distinguer le flairage de l'animal, du « sniff » chez l'homme. Dans le premier cas, chez l'animal, le flairage est un acte spontané comme on va le décrire dans le paragraphe suivant. C'est l'opposé dans la plupart des études chez l'Homme, où l'acte de flairer une odeur est imposé par une consigne. Effectivement, l'expérimentateur demande à son sujet de moduler de façon consciente sa façon de flairer une odeur.

Mes travaux de thèse se sont concentrés sur un modèle animal, le rat, dont le flairage est un des comportements les plus stéréotypés (Welker, 1964 ; Youngentob *et al.*, 1987). Ce comportement a été décrit par Welker (1964) en utilisant la vidéographie avec une fréquence d'acquisition de 34 à 64 images par seconde, lui permettant de disséquer chaque image du comportement exploratoire. Un cycle respiratoire comprend une alternance entre phases inspiratoires et expiratoires. Chaque cycle crée une période d'échantillonnage de l'environnement olfactif. Les comportements exploratoires, en général, vont induire une succession plus rapide et régulière de cycles respiratoires, c'est le flairage. C'est donc un acte périodique et intermittent. De plus, Welker (1964) a montré que le comportement exploratoire du rat était caractérisé par une séquence d'événements extrêmement précise faisant intervenir le flairage et des mouvements stéréotypés des vibrisses, du nez et de la tête. Tout d'abord, lorsque le rat approche la tête (en jaune sur la Fig. 12) d'une cible odorante, il protracte ses vibrisses (orange sur la Fig. 12),

inspire (l'inspiration est représentée vers le bas sur la Fig. 12) et rétracte son nez (vert sur la Fig. 12). La phase d'expiration qui s'en suit est, elle, accompagnée du retrait de la tête, de la rétractation des vibrisses et de la protraction du nez. Une nouvelle séquence d'événements démarre à l'inspiration suivante.

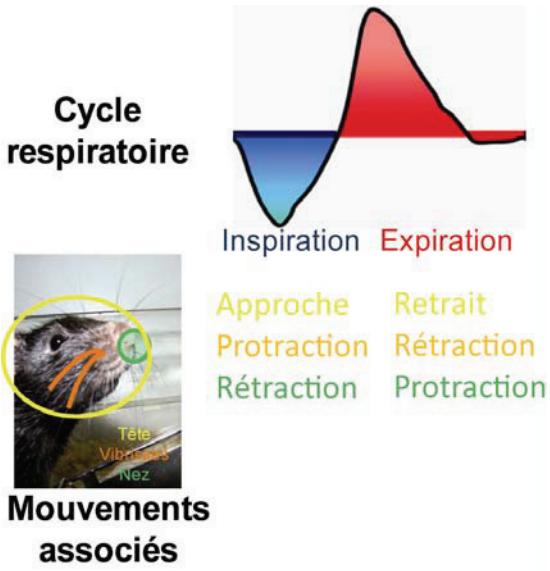


Figure 12: Le flairage: un comportement stéréotypé. En haut, représentation schématique d'un cycle respiratoire, avec vers le bas et en bleu l'inspiration et vers le haut et en rouge, l'expiration. Associés à ces deux phases, différents mouvements de l'ensemble de la gueule de l'animal : la tête (jaune), les vibrisses (orange) et le nez (vert). Figure adaptée d'après Welker, 1964

1.3.1 La respiration, un acte moteur indispensable à la perception olfactive

Les premières démonstrations de l'indissociable lien entre respiration et perception olfactive ont commencé dès la fin du XIXème siècle. Les premières expériences ont été menées chez l'Homme et étaient éthiquement contestables. Le Dr Proetz (Proetz, 1941) utilisa ses propres étudiants pour démontrer que la perception olfactive ne pouvait se faire sans mouvements respiratoires. Une des expériences consistait à allonger un étudiant, la tête en arrière et lui remplir les narines de liquide physiologique. Dans ce liquide physiologique, de l'eau de cologne était diluée. Dans ce cas, les étudiants ne percevaient aucune odeur. Aucun mouvement d'air n'était possible avec la cavité nasale remplie de liquide physiologique. Or dans cette étude qui laisse entrevoir l'importance de l'acte respiratoire dans la perception, on ne peut pas confirmer si l'absence de perception est effectivement due à l'absence de mouvements d'air ou si elle est due au fait que les molécules odorantes diluées dans le liquide physiologique aient bien atteint l'EO. Deux décennies plus tard, Bocca et son équipe, chez l'animal et l'Homme, apportèrent une plus convaincante démonstration de l'importance des mouvements respiratoires pour la perception olfactive (Bocca *et al.*, 1965). Bocca et ses collaborateurs proposèrent deux expériences chez l'Homme. Dans chacune d'elles, une injection intraveineuse de l'odeur

(essences de citral ou de menthe) était pratiquée. Dans la 1ère, ils demandaient à leur sujet de rester en apnée. En l'absence de respiration, aucune perception olfactive n'était ressentie. Lorsqu'ils demandaient au sujet de respirer, il y avait alors perception de l'odeur. Dans la 2ème expérience, les auteurs demandaient à leur sujet de rester en apnée mais, faisaient circuler un flux d'air constant à un débit de 0.5L/minute dans leur nez. Les sujets percevaient alors l'odeur. La conclusion de ces études, est donc que si aucun flux d'air n'est présent dans la cavité nasale, la perception olfactive n'est pas possible. L'acte respiratoire est donc nécessaire à la perception olfactive.

Des études portant sur l'imagerie mentale olfactive (définie comme la création d'une représentation neuronale en l'absence de stimulus externe) ont également montré un lien étroit entre respiration et imagerie mentale. Premièrement, si l'on vous demande d'imaginer une odeur, vous allez spontanément renifler. Deuxièmement, si l'on bloque votre respiration nasale, votre capacité à imaginer une odeur sera fortement diminuée (Bensafi *et al.*, 2003 ; Kleemann *et al.*, 2009).

Nous allons voir dans une première partie quels sont les supports de cet indissociable lien perception olfactive - acte respiratoire.

1.3.2 Les supports anatomo-fonctionnels de l'inextricable relation olfaction-respiration

L'inextricable relation olfaction-respiration va mettre en jeu plusieurs paramètres. Le premier est bien sûr l'anatomie et la circulation de l'air dans la cavité nasale. Le deuxième est la structure physico-chimique des molécules. Enfin le dernier paramètre est la mécano-sensibilité des neurorécepteurs olfactifs.

1.3.2.1 Circulation de l'air dans la cavité nasale lors de l'inspiration

1.3.2.1.1 Description de la cavité nasale

La cavité nasale est composée de deux espaces creusés dans l'os maxillaire, séparés par le septum nasal. Elle commence par les narines permettant une communication directe avec l'environnement. Elle s'étend en postérieur en passant par le nasopharynx et l'oropharynx jusqu'à l'épiglotte. Au niveau ventral, la cavité nasale repose sur les os maxillaire et palatin, au dessus du palais (Fig. 13A). Au niveau dorsal, la cavité est limitée par l'os nasal et l'ethmoïde. Au niveau latéral, on retrouve des « extensions » osseuses maxillaires et ethmoïdales qui s'étendent d'avant en arrière, placées en dérivation sur les voies respiratoires, c'est ce qu'on appelle les cornets maxillaires et ethmoïdaux.

Au sein de la cavité nasale, on peut distinguer deux types d'épithélium : l'épithélium pluristratifié respiratoire et l'épithélium olfactif (EO). Ces épithéliums reposent sur des territoires différents de la cavité nasale. Ainsi, on retrouve l'EO dans les parties supérieures et postérieures du septum nasal ainsi que sur les cornets (Le Gros Clark, 1951). L'épithélium respiratoire lui se retrouve sur les autres zones de la cavité nasale.
Les coupes transversales de la cavité nasale de rat (Kelemen, 1947) ainsi que des moulages en silicones (Schreider et Raabe 1981) ont mis en évidence sa complexité anatomique. Ce qui est important de noter, c'est la complexité des replis des cornets. Ces nombreux cornets offrent à l'EO une plus grande surface d'échange avec l'air, allant jusqu'à plusieurs dizaines de cm2 chez le rat, mais offrent également plusieurs chemins d'accès possible pour l'air (Fig. 13B).

1.3.2.1.2 Circulation des flux d'air

Les premières tentatives de représentation de la circulation de l'air dans la cavité nasale ont été réalisées par le Dr. Proetz sur des cadavres humains (1951). Le Dr Proetz étudiait la circulation des flux d'air dans la cavité nasale de ces cadavres grâce à l'utilisation de la fumée de cigarettes. L'utilisation de modèles numériques permettant la reconstruction de la cavité nasale (à partir de moulage, de données d'imagerie cérébrale…) a permis des études détaillées de la dynamique des fluides dans la cavité nasale. Lors de l'inspiration, l'air pénètre dans la cavité nasale par les narines. Il va être dirigé en premier vers les zones dorsales et médianes de la cavité nasale (Fig. 13B ; comme indiqué sur le schéma par la flèche du haut). Il atteindra ensuite les zones latérales et ventrales (Yang *et al.*, 2007 ; Fig. 13B) pour enfin sortir de la cavité nasale en passant par le nasopharynx. On peut noter que la vitesse du flux d'air est diminuée lorsque celui-ci pénètre dans les zones latérales (Keyhani *et al.*, 1997). Les conduits étroits de la cavité nasale de rat font que le flux d'air dans la cavité nasale est de type laminaire (Hahn *et al.*, 1993 ; Kelly *et al.*, 2000). Cela signifie que contrairement à un flux turbulent, le flux stable de type laminaire ne cause pas de fluctuations fortes de la vitesse d'écoulement. Ainsi, il est probable que ce qui régit la concentration des molécules dans la cavité nasale est fonction des propriétés des molécules et non pas des turbulences.

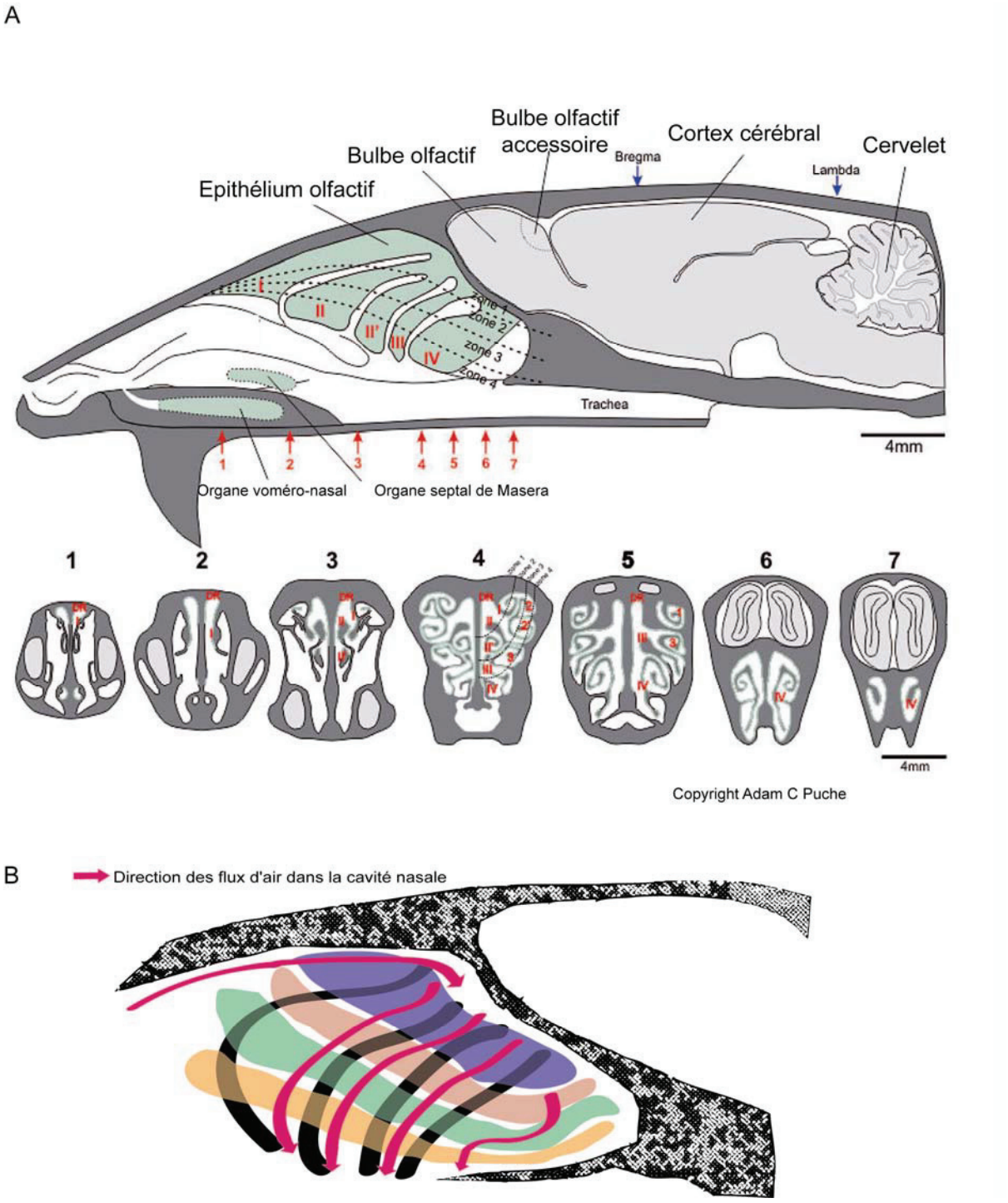


Figure 13 : A) Représentation schématique d'une cavité nasale de rat. En haut coupe sagittale de la tête d'un rat, avec de l'avant vers l'arrière, les narines, la cavité nasale et ses cornets olfactifs, le BO en avant du cerveau et le reste du cerveau. Les chiffres romains I, II, III, IV et V représentent les cornets. Les flèches rouges (1-7) montrent le lieu des coupes coronales au niveau de la cavité nasale. En bas, différentes coupes coronales de l'avant vers l'arrière de la cavité nasale. Ces coupes illustrent bien la complexité des cornets olfactifs. Figure adaptée de Adam C. Puche, copyright Academic Press (Shipley, M.T., Puche, A.C., Ennis, M. (2003) The olfactory system. In The Rat Nervous System. George Paxinos Ed., Academic press, NY). B) Illustration de la direction des flux d'air dans la cavité nasale lors d'une inspiration. Coupe sagittale de la cavité nasale de rat. On retrouve les 4 grandes zones de répartition des protéines réceptrices aux odeurs (bleu, rose, vert et orange). En magenta, la direction des flux d'air est symbolisée. Lors d'une inspiration, l'air atteint d'abord les zones dorso-médianes de l'EO puis se dirige vers les zones latéro-ventrales. Adapté de Schoenfeld et Cleland, 2005.

1.3.2.2 La cavité nasale comme un chromatographe : patterns imposés

Selon leurs propriétés physico-chimiques, les molécules odorantes ont des migrations et des propriétés de sorption différentielles dans l'EO, ce qui a conduit Mozell à comparer le nez à un chromatographe.

Mozell (Mozell, 1964a,b ; 1966) enregistra l'activité de deux branches du nerf olfactif l'une ayant pour origine les zones latérales de l'EO et l'autre, les zones médianes. Il montra des différences de ratio d'amplitude de réponses entre les parties latérales et médianes de l'EO en fonction des odeurs. Le ratio des réponses latérales/médianes diminuait avec l'augmentation de solubilité des odeurs. Mozell proposa alors que le nez fonctionnerait comme un chromatographe. De plus, cet auteur montra qu'il existait une différence de latence de réponses entre les zones médianes et latérales: le temps de rétention des odeurs dans la cavité nasale est spécifique des odeurs utilisées. Par exemple, le limonène et l'octane produisent de très courtes différences de latence à l'opposé du citral ou du géraniol (Pour revue, Mozell, 1970). Or l'effet observé pouvait être uniquement dû à la sélectivité de réponse des zones latérales et médianes. Mais Mozell montra que si l'on inversait la direction du flux d'air, le ratio, cette fois-ci, des réponses médianes/latérales diminuaient également avec l'augmentation de solubilité des odeurs. Mozell conclut donc qu'il y avait une sorption différentielle des odorants au sein de la cavité nasale. Cette preuve indirecte de l'effet chromatographique fut ensuite confirmée par l'étude de Mozell et Jagodowicz (1973). En connectant un chromatographe en phase gazeuse au nez d'une grenouille, ces auteurs montrèrent une corrélation directe entre le temps de rétention des molécules dans le chromatographe et celui mesuré au niveau de l'EO. Par exemple, une molécule hydrophile et de faible volatilité comme le méthyl benzoate, est plus retenue par le nez (et dans le chromatographe) que des odeurs hydrophobes et de forte volatilité. A cause de ces différences de sorption et parce que le flux d'air nasal est de type laminaire (Schoenfeld et Cleland, 2005), les odeurs selon leurs propriétés, ne vont pas atteindre les mêmes zones de la cavité nasale. Effectivement, en utilisant des marqueurs radioactifs couplés à différentes molécules odorantes, Hornung et Mozell (1977 ; 1980) ont pu mettre en évidence que les molécules très solubles dans le mucus se déposent rapidement dans la cavité nasale sans atteindre les zones plus internes alors que les odeurs peu solubles, elles, ont tendance à se déposer sur l'ensemble du chemin de l'EO emprunté par l'air. Un autre exemple provient des études de modélisation de la migration des molécules le long de l'EO. Par exemple, la carvone (molécule hydrophile et de faible volatilité) est distribuée par le flux d'air sur les portions les plus en avant et les plus médianes de l'EO (Yang *et al.*, 2007 ; Fig. 14) contrairement aux molécules hydrophobes comme l'octane.
Au cours d'une même inspiration, les molécules odorantes qui ont des propriétés physico-chimiques différentes ne migrent donc pas de la même façon dans la cavité nasale et produisent donc des patterns d'activation différentiels dans l'EO : c'est ce que Mozell a qualifié de « patterns

imposés ». Ce sont donc des patterns qui sont imposés par un composé extérieur à l'EO (la migration des odeurs), par opposition aux patterns inhérents liés à la répartition topographique des protéines réceptrices (voir paragraphe 1.2.1.3).



Figure 14 Migration différentielle des molécules odorantes lors de l'inspiration en fonction de leurs propriétés physico-chimiques. Représentation de 4 coupes transversales de cavité nasale de rat, de la gauche vers la droite, coupes de l'axe antérieur vers postérieur. Les traits blancs (sur le fond noir) représentent les zones de l'EO où se sont déposées les molécules odorantes. On voit que pour une même inspiration, l'octane et la carvone, ne se déposent pas aux mêmes endroits de la cavité nasale. La carvone se déposant rapidement, à l'avant de l'EO alors que l'octane atteint des zones plus postérieures et plus latérales. Adapté d'après Yang *et al.*, 2007.

Finalement, l'activation spatiale de l'EO est conditionnée à la fois par 1) la répartition spatiale des protéines réceptrices aux odeurs et leurs sensibilités aux odeurs (patterns inhérents) et 2) la migration différentielle des molécules odorantes dans la cavité nasale *via* la respiration (patterns imposés). La combinaison de ces deux facteurs crée une activation spatiale spécifique au niveau de l'EO. En plus de ce pattern imposé par la respiration, il semblerait, que l'inextricable relation olfaction-respiration trouve également un autre support : la mécano-sensibilité des cellules réceptrices.

1.3.2.3 Un message uniquement olfactif ? Les neurorécepteurs olfactifs sont aussi mécano-sensibles

Déjà en 1951, Adrian (1951, 1954) avait montré que le système olfactif pouvait répondre à de l'air pur. Il émit alors l'hypothèse que le système olfactif pourrait être mécano-sensible. Cependant, il se rétracta ensuite pour proposer que ces réponses fussent certainement liées à une pollution odorante. Sa première hypothèse fut tout de même reprise par Ueki et Domino (1961) puis Bocca *et al.* (1965). Ueki et Domino en utilisant une méthode de double canulation chez le chien ont pu jouer sur l'air passant dans la cavité nasale. Ils ont démontré que le réseau bulbaire répondait à de l'air pur désodorisé. De plus, cette réponse bulbaire à l'air pur était

sensible à la vélocité du flux d'air. Ueki et Domino ont alors proposé que les neurorécepteurs olfactifs seraient non seulement des détecteurs d'odeurs mais également mécano-sensibles. Dans cette ligne d'idées, Potter et Chorover (1976) ont montré des ondes EOG en réponse à de l'air pur. Plus récemment, chez l'Homme, grâce à une étude d'imagerie fonctionnelle, Sobel *et al.* (1998a) ont démontré une activation du cortex piriforme en réponse à de l'air pur. Ainsi, il semble que l'air sans odeur puisse activer le système olfactif. Ces différentes données, tendant à montrer une réponse du système olfactif à la pression de l'air, ont trouvé un support en 2007. Grosmaitre *et al*. (2007) ont montré sur des explants de l'EO que les neurorécepteurs olfactifs pouvaient répondre à la pression (envoi de Ringer à différentes pressions et distances des neurorécepteurs, Fig. 15A, B). 49% des neurorécepteurs enregistrés dans l'EO principal répondent à cette stimulation mécanique. Ces auteurs ont démontré que la voie de transduction impliquée dans la mécano-réception implique le second messager AMPc et les CNG. De façon très importante, en utilisant des souris Knock-out cnga2$^{-/y}$, ces auteurs ont montré que la relation entre respiration et activité rythmée du BO (nous reviendrons plus en détails dans le chapitre suivant sur les activités rythmées) était éliminée.

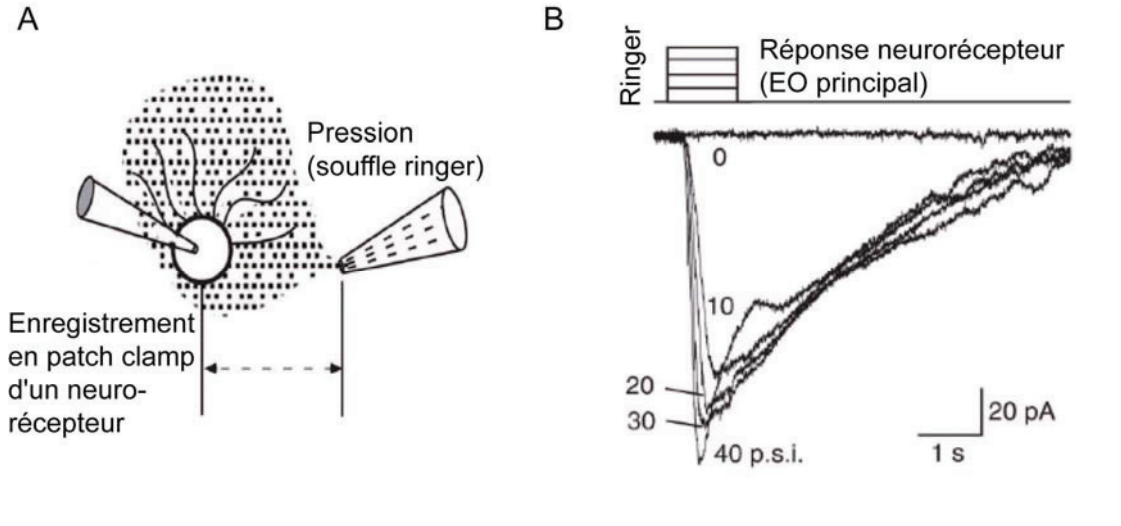


Figure 15 Mise en évidence de la mécanosensibilité des neurorécepteurs olfactifs. A) Schéma de la configuration d'enregistrement. Ces données sont issues d'enregistrements de neurorécepteurs sur des explants d'EO en mode voltage-clamp. A distance plus ou moins proche, une pipette permettait de d'appliquer une pression au NR enregistré. B) Réponse d'un neurorécepteur à l'application de différentes pressions. On voit bien que le neurorécepteur 1) répond à la pression et 2) répond de manière plus ou moins graduelle à l'augmentation de pression. Figure adaptée de Grosmaitre *et al.* (2007).

1.3.2.4 Autre support : une origine centrale ?

Il faut noter que les supports anatomo-fonctionnels de la relation olfaction-respiration énoncés ci-dessus n'en excluent pas d'autres. J'ai choisi de me focaliser sur les supports périphériques qui sont les plus documentés et parce que je me suis intéressée aux effets des variations de

respiration sur l'activité du système olfactif, mais une origine centrale peut également être avancée. De nombreuses aires corticales se projettent au niveau du BO, il ne semble donc pas impossible, que par un relais indirect, des centres respiratoires se projettent au niveau du BO. Cela va dans le sens des travaux de Ravel *et al.* (1987 ; Ravel et Pager, 1990) montrant que chez un animal trachéotomisé et sans air dans la cavité nasale, certaines cellules M/P préservent leur activité de décharge synchronisée à la respiration de l'animal. Ces auteurs ont proposé que la persistance de ce rythme provienne des aires respiratoires (noyau médial parabrachial) se projetant sur le BO via le noyau pré-optique magno-cellulaire. Ces travaux sont en opposition avec la majorité des autres études montrant 1) que lorsque l'air ne passe plus dans la cavité nasale, l'activité du système olfactif n'est plus liée à la respiration (Onoda et Mori, 1980) et 2) lorsque le flux d'air nasal est déphasé, à l'aide d'une double canulation, de la respiration de l'animal, les cellules M/P suivent la périphérie et non le rythme central (Sobel et Tank, 1993). Il semble donc que les supports majoritaires de la relation olfaction-respiration soient tout de même périphériques.

1.3.3 Tous au rythme respiratoire : effets de la respiration sur l'activité du système olfactif

L'activité du système olfactif est rythmée, imprégnée par la respiration et cette affirmation est vraie des niveaux les plus périphériques (EO) jusqu'au niveau cortical (cortex piriforme). Le BO étant la structure d'étude de ma thèse, nous détaillerons plus précisément ses activités.

1.3.3.1 Epithélium olfactif: activité rythmée par la respiration

De nombreuses études ont caractérisé les réponses de l'EO, afin de déterminer si l'EO avait des réponses aux odeurs topographiquement distribuées (Paragraphe 1.2.1.3). Pour autant, peu d'entre elles se sont intéressées à la réponse temporelle de l'EO, particulièrement par rapport à la respiration. Cela vient du fait que la majorité des études sont réalisées uniquement sur une portion extraite de cavité nasale et de la difficulté technique d'enregistrer la muqueuse en laissant l'animal respirer librement. En enregistrant l'EOG chez l'animal anesthésié et en utilisant une inspiration artificielle, Onoda et Mori (1980) ont montré que l'EO répondait à chaque inspiration, et ce même en l'absence d'odeur. De plus, Chaput (2000), chez l'animal anesthésié respirant librement, a montré que la réponse de l'EO aux odeurs était rythmée par la respiration (Fig. 16A, C). La réponse maximale de l'EOG aux odeurs se produit au cours du 1er cycle respiratoire suivant l'arrivée de l'odeur. Après le premier cycle, l'onde EOG synchronisée à la respiration persiste mais présente une diminution d'amplitude, interprétée comme étant une habituation à l'odeur. La réponse maximale de l'EOG à l'odeur se produit à un moment spécifique du cycle respiratoire : à la transition entre l'inspiration et l'expiration. Cette relation entre EOG

et respiration a également été observée chez le rat non anesthésié respirant librement (Chaput et Chalansonnet, 1997).

L'enregistrement de l'activité unitaire des NR *in vivo* chez le rat est un challenge, puisque les cornets olfactifs sont des structures complexes et à cause du haut risque hémorragique. Peu de données sont donc disponibles. Mais parmi elles, Duchamp-Viret *et al.* (2005) ont montré que les NR déchargeaient de façon rythmée, synchronisée à la respiration et ce même en l'absence d'odeur (Fig. 16B, C ; pour revue Chaput *et al.*, 2002).

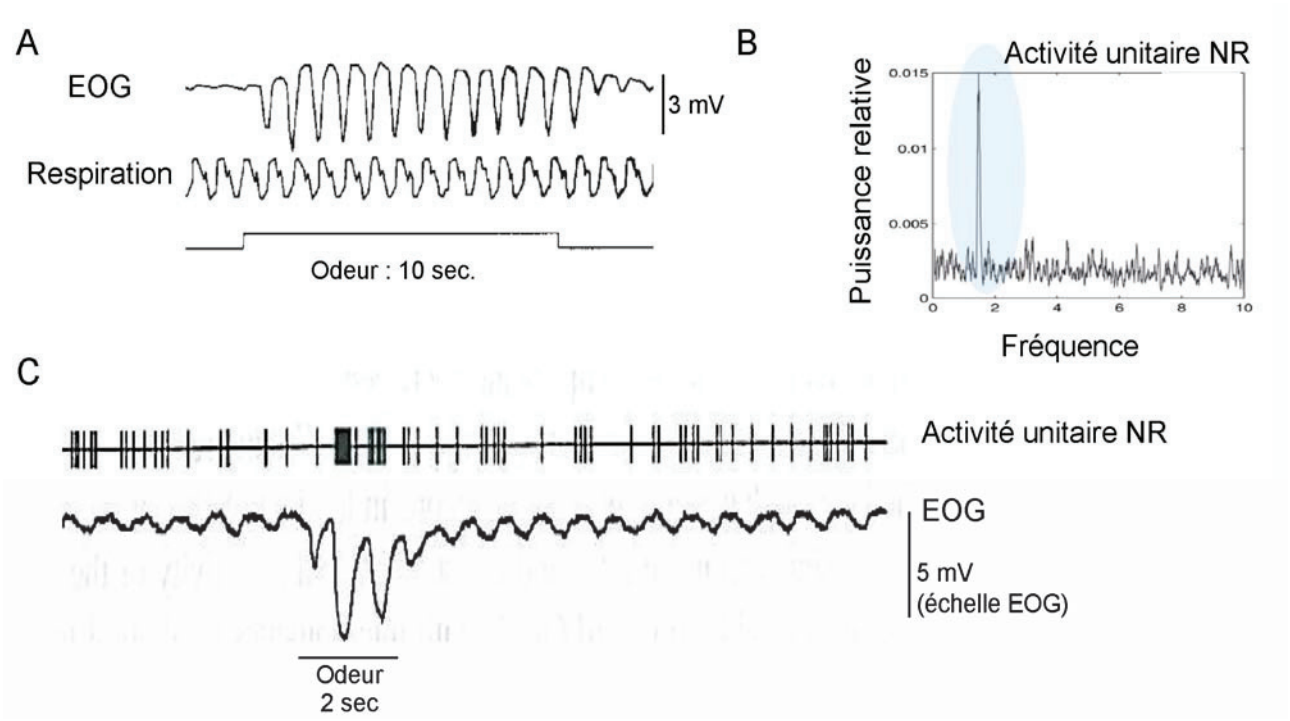


Figure 16: A) Enregistrement EOG en réponse à une stimulation odorante. Du haut vers le bas, tracé EOG ; tracé respiratoire et stimulation odorante. On voit très nettement que la réponse EOG est rythmée par la respiration. D'après Chaput, 2000. B) Les neurorécepteurs (NR) déchargent de façon spontanée (en l'absence d'odeur), rythmée à la respiration. Exemple de l'activité de décharge d'un NR (FB 35) chez un rat respirant librement. Puissance relative de la décharge en fonction de la fréquence, on voit nettement un pic de décharge autour des 2Hz, bande de fréquence de la respiration. D'après Duchamp-viret *et al.*, 2005. C) Enregistrement simultané d'un NR (tracé du haut) et de l'EOG (tracé du bas). Les deux activités sont liées, le NR décharge à des phases spécifiques de l'EOG. D'après Chaput *et al.*, 2002.

1.3.3.2 L'arrivée au rythme respiratoire du message spatio-temporel à l'entrée du BO

L'activité des NR peut également être observée et enregistrée au niveau de leur terminaison : à l'entrée du BO (étage glomérulaire). Cela est notamment rendu possible par l'utilisation de marqueurs calciques fluorescents injectés au niveau de la muqueuse. Le marqueur fluorescent pénètre dans les NR. Ainsi, à l'aide d'une caméra spécifique, les variations de concentration de calcium intra cellulaire présynaptique peuvent être suivies à la surface du BO. Des cartes spatiales spécifiques se développent à la surface du BO en réponse aux odeurs (partie 1.2.1.5).

Ces cartes ont été le plus souvent représentées comme des entités statiques. Or, le système olfactif est un système dynamique, où le stimulus évolue au cours d'un cycle respiratoire. Il a été montré que, au cours d'une stimulation odorante, un glomérule peut s'activer et présenter un pattern de réponse synchronisé à la respiration (Spors *et al.*, 2006 ; Carey *et al.*, 2009 ; Cheung *et al.*, 2009 ; Fletcher *et al.*, 2009 ; Lecoq *et al.*, 2009 ; Wesson *et al.*,2009). Spors et ses collaborateurs (2006) ont précisément décrit la dynamique temporelle de l'entrée glomérulaire (Fig. 17A, B, C). Sur la figure 17B, on peut voir une carte d'activation bulbaire moyenne au cours d'une stimulation odorante. Si l'on décompose la stimulation en échantillons de temps d'environ 150ms, on peut voir que la carte d'activation varie au cours du temps. Si l'on regarde non pas toute la carte mais un seul glomérule, on voit alors très nettement que son activation est liée à la respiration (Fig. 17C). Et de façon encore plus intéressante, chaque glomérule possède sa propre latence d'activation et surtout sa propre « force » de modulation respiratoire**.** Différents auteurs ont montré que la modulation respiratoire glomérulaire persistait même en l'absence d'odeur (Carey *et al.*, 2009 ; Fletcher *et al.*, 2009). Il faut noter que si cette modulation est présente en l'absence d'odeur, son amplitude est, elle, bien inférieure à celle mesurée pendant la stimulation odorante.

Il est également possible d'enregistrer ce type de signaux chez des animaux vigiles. Là encore, les auteurs ont montré que l'on pouvait retrouver une dynamique glomérulaire liée au rythme respiratoire (Verhagen *et al.*, 2007 ; Carey *et al.*, 2009 ; Wesson *et al.*, 2008a). Mais plus précisément, ces auteurs ont montré que la rythmicité respiratoire glomérulaire était maintenue et présente jusqu'à une fréquence de flairage de 6Hz, au-delà de cette fréquence respiratoire, les auteurs ont noté une atténuation voire une suppression de la modulation respiratoire.

Les études énumérées ci-dessus utilisent un marqueur calcique au niveau des NR. Mais il existe d'autres marqueurs qui permettent de mesurer l'activité post-synaptique glomérulaire. Spors et Grinvald (2002) ont montré sur l'animal anesthésié que l'image d'activation post synaptique était elle aussi dynamique et liée à la respiration. Là encore, l'activation glomérulaire est également modulée par la respiration en l'absence d'odeur. Dans notre groupe, nous avons également montré la forte relation entre signal respiratoire et dynamique spatio-temporelle post-synaptique (Esclassan *et al.*, 2012). Plus précisément, nous avons été les premiers à montrer que l'activité temporelle post-synaptique glomérulaire en relation avec le rythme respiratoire pouvait être maintenue jusqu'à de hautes fréquences respiratoires (10 Hz). Cette dernière donnée est très importante puisqu'elle contraste avec les données de Verhagen *et al.* (2007) et montre que le système est bel et bien capable de maintenir une activité en lien avec la respiration jusqu'à de hautes fréquences respiratoires.

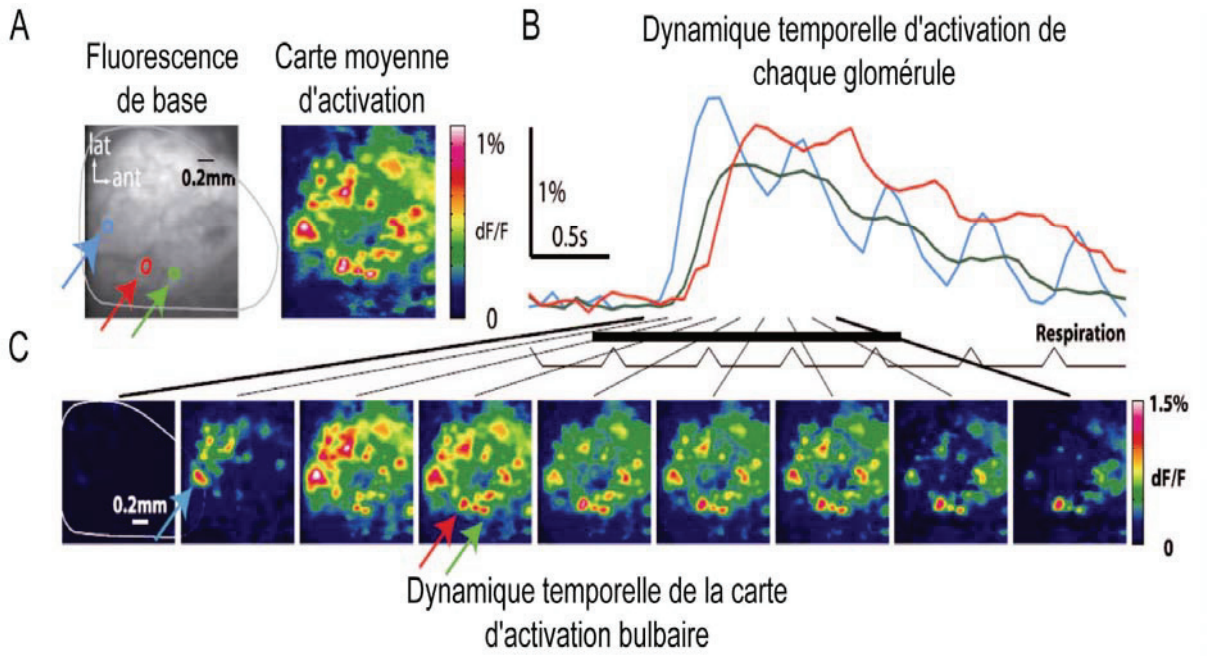


Figure 17 Réponse spatio-temporelle du BO aux odeurs. A) A gauche, image du BO dorsal après le chargement des axones des neurorécepteurs avec le marqueur vert calcique 1dextrane. Le contour du BO est affiché en gris clair. 3 glomérules sont entourés (bleu, rouge, vert). A droite, on retrouve le changement relatif de fluorescence enregistré en réponse à une odeur (butyrate d'éthyle). La carte d'activation est moyennée sur l'ensemble de la stimulation odorante. Les changements de fluorescence sont exprimés pour chaque pixel comme le changement de fluorescence (dF) sur la fluorescence de base (dF/F). B) Décours temporel d'activation de trois glomérules (bleu, rouge et vert) en fonction du temps. Le trait noir en gras représente la stimulation odorante. En dessous, on peut voir les déflexions vers le haut qui représentent les inspirations. Les variations de fluorescence suivent la respiration. C) Evolution des cartes spatiales d'activation au cours du temps. Les fenêtres temporelles sont de 154ms. Les flèches indiquent les glomérules représentés dans A et B. Adapté d'après Spors *et al.*, 2006.

1.3.3.3 L'étage bulbaire: tous les niveaux d'activité sont rythmés par la respiration

1.3.3.3.1 Potentiel de champ local et rythme respiratoire

Chez l'animal anesthésié, lorsque l'on implante une électrode de faible impédance dans le BO, on peut enregistrer un rythme lent, compris entre 1 et 3 Hz, dans le PCL. Ce rythme s'exprime et s'amplifie lors de la présentation de l'odeur. Si l'on enregistre en parallèle la respiration de l'animal, ce rythme lent s'avère être complètement corrélé à l'activité respiratoire. Ce rythme lent a été pour la première fois décrit dans le BO par Lord Adrian en 1942 (qu'il nommait "intrinsic waves"). Chez l'animal vigile, cette modulation a également été décrite (Moulton et Tucker, 1964 ; Freeman et Schneider, 1982; Gray et Skinner, 1988b).

Grâce à des électrodes à plusieurs voies, disposées de façon linéaire, on peut enregistrer l'activité de toutes les couches du BO. La modulation respiratoire du PCL s'exprime dans toutes les couches du BO (Fig. 18 ; Buonviso *et al.*, 2003 ; 2006) mais selon la couche, présente une polarité différente (Fig. 18).

La modulation respiratoire présente au niveau de l'entrée du bulbe se retrouve donc au niveau du réseau bulbaire. Cet élément est d'autant plus important qu'il module la présence de rythmes plus rapides (beta et gamma).

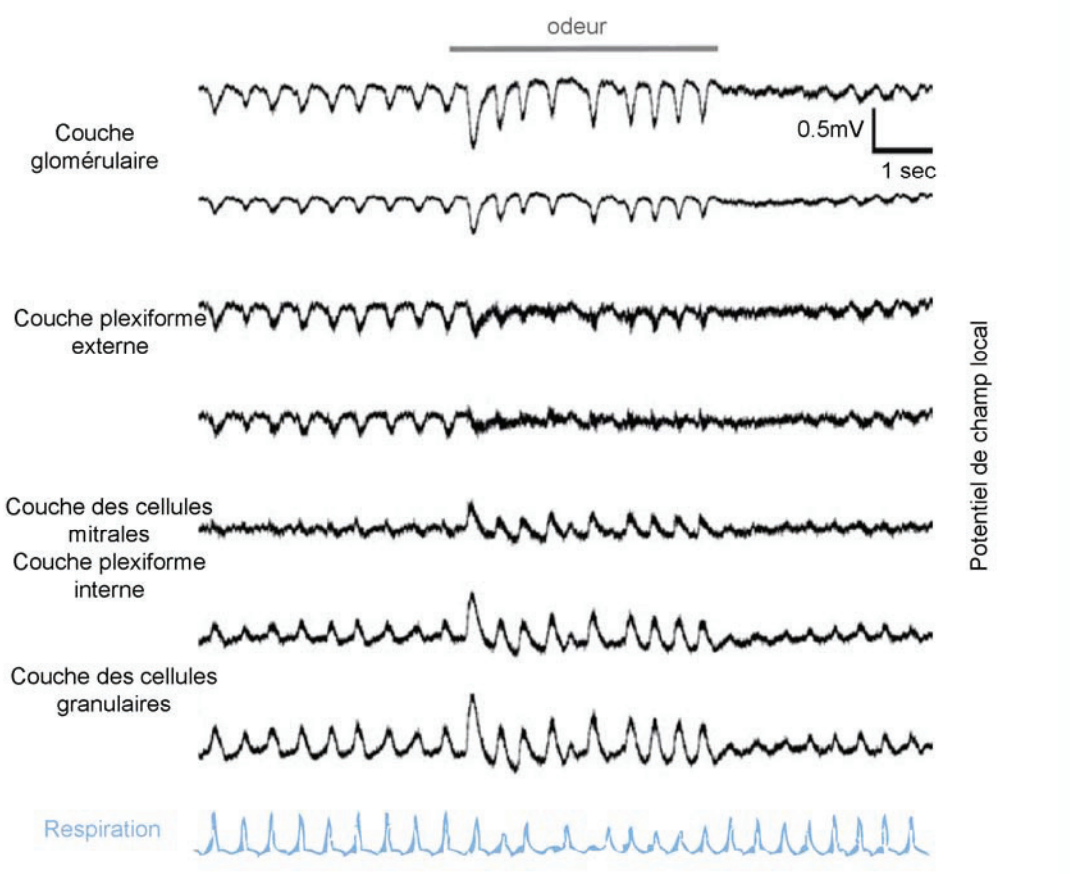


Figure 18 La modulation respiratoire du PCL se retrouve dans toutes les couches du BO. Exemple d'un enregistrement de PCL en simultané dans plusieurs couches bulbaires. Cet enregistrement a été obtenu à l'aide d'électrode à plusieurs voies placées linéairement et espacées de 50µm, chez le rat anesthésié à l'uréthane respirant librement. La barre grise, en haut, représente l'odeur. En bas (en bleu), on retrouve un tracé de la respiration. On retrouve en l'absence d'odeur une modulation respiratoire du PCL et ce quelle que soit la couche du BO. L'amplitude de cette modulation augmente en présence d'odeur. Tracés personnels de N. Buonviso.

Comme décrit dans le paragraphe 1.2.3.2.2, la stimulation odorante induit, chez l'animal anesthésié, des oscillations rapides, dans les bandes gamma (35-90 Hz) et beta (10-30Hz), dans les PCL. Ces oscillations rapides vont se superposer à la modulation respiratoire du PCL. La caractéristique de ces oscillations, est qu'elles ont une occurrence spécifique par rapport au cycle respiratoire. Ainsi, au cours d'un cycle respiratoire, on retrouve une alternance des bouffées oscillatoires gamma et beta (Fig. 19). Les oscillations gamma apparaissent spécifiquement à la transition entre l'inspiration et l'expiration en réponse à l'odeur chez l'animal anesthésié (Kashiwadani *et al.*, 1999 ; Buonviso *et al.*, 2003 ; 2006). Cette occurrence spécifique à la transition entre inspiration et expiration est vraie quelle que soit l'odeur utilisée (Cenier *et al.*, 2008). Les oscillations beta apparaissent, quant à elles, en réponse à l'odeur, de la fin de l'expiration au début d'inspiration (Buonviso *et al.*, 2003). Contrairement au gamma, le

beta a une phase respiratoire qui est plus variable et fonction des odeurs utilisées (Cenier *et al.,* 2008).

Chez l'animal vigile, l'occurrence des oscillations est différente de chez l'animal anesthésié, puisqu'on retrouve des oscillations gamma en l'absence d'odeur (Ravel *et al.*, 2003 ; Gervais *et al.*, 2007) et puisque l'occurrence de bouffées gamma et beta dépend de la tâche comportementale dans laquelle le rat est engagé (Martin *et al.*, 2004 ; 2006). Mais de façon importante, le rythme gamma s'exprime toujours de façon rythmée à la respiration, en apparaissant de façon spécifique à la transition entre inspiration et expiration (Freeman et Schneider, 1982 ; Freeman et Viana Di Prisco, 1986 ; Bressler, 1987 ; Gray et Skinner, 1988a).

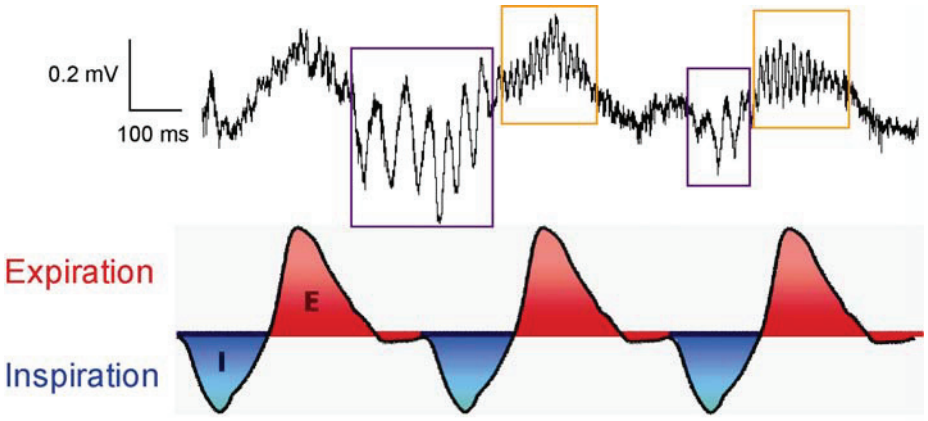


Figure 19 Toutes les activités oscillatoires du BO sont liées à la respiration. En haut, exemple d'un enregistrement du PCL dans le BO de rat anesthésié (à l'uréthane) en réponse à une odeur ; en bas représentation schématique de trois cycles respiratoires avec en rouge l'expiration et en bleu l'inspiration. Les rythmes beta (10-30hz) sont encadrés en violet et les rythmes gamma (35-90hz) sont encadrés en orange. On voit tout d'abord une oscillation lente du PCL au même rythme que la respiration: c'est la modulation respiratoire. Superposés à cette dernière les rythmes rapides dont l'occurrence est spécifique vis-à-vis des phases de la respiration. Le beta apparaît à la fin de l'expiration et le gamma à la transition entre l'inspiration et l'expiration. Tracés personnels.

1.3.3.3.2 Activité rythmée des cellules M/P

Activité unitaire : potentiels d'action

Si l'on enregistre l'activité des cellules M/P, une rythmicité respiratoire évidente s'exprime au niveau de la décharge des potentiels d'action (Fig. 20A). Ces décharges synchronisées par rapport à la respiration sont présentes en l'absence et lors d'une stimulation odorante (Walsh, 1956 ; Moulton et Tucker, 1964 ; Potter et Chorover, 1976 ; Chaput et Holley, 1979 ; Onoda et Mori, 1980 ; Ravel et Pager, 1990 ; Sobel et Tank, 1993 ; Philpot *et al.*, 1998 ; Buonviso *et al.*, 2003 ; Khan *et al.*, 2008). L'importance de la rythmicité respiratoire de l'activité des cellules M/P a été mise en évidence par Macrides et Chorover (1972). Ces auteurs ont montré que les cellules M/P pouvaient répondre aux odeurs sans pour autant changer leur fréquence de décharge (Fig. 20B). En effet, la réponse d'une cellule M/P à une odeur n'est pas une simple augmentation ou diminution de sa fréquence de décharge mais une réorganisation temporelle de

sa décharge en fonction du cycle respiratoire. Chaput et Holley (1980), quelques années plus tard, chez le lapin vigile respirant librement, ont montré que lors de la présentation d'une molécule odorante, les cellules M/P répondaient par un remaniement de leur décharge en fonction des phases du cycle respiratoire. Par exemple la réponse à la stimulation odorante de certaines cellules M/P est caractérisée par une augmentation de la fréquence de décharge à chaque phase inspiratoire avec une diminution pendant l'expiration alors que d'autres réponses présentent une diminution de décharge pendant la phase inspiratoire. Les cellules M/P ne présentent donc pas qu'un seul pattern de décharge par rapport au cycle respiratoire. Walsh (1956) réalisa la première classification de l'activité des cellules M par rapport au cycle respiratoire. Onoda et Mori (1980) proposèrent également une classification basée sur la relation de phase avec l'EOG (lui-même lié à la respiration) ainsi que sur l'activité spontanée (en l'absence d'odeur) des cellules M/P.

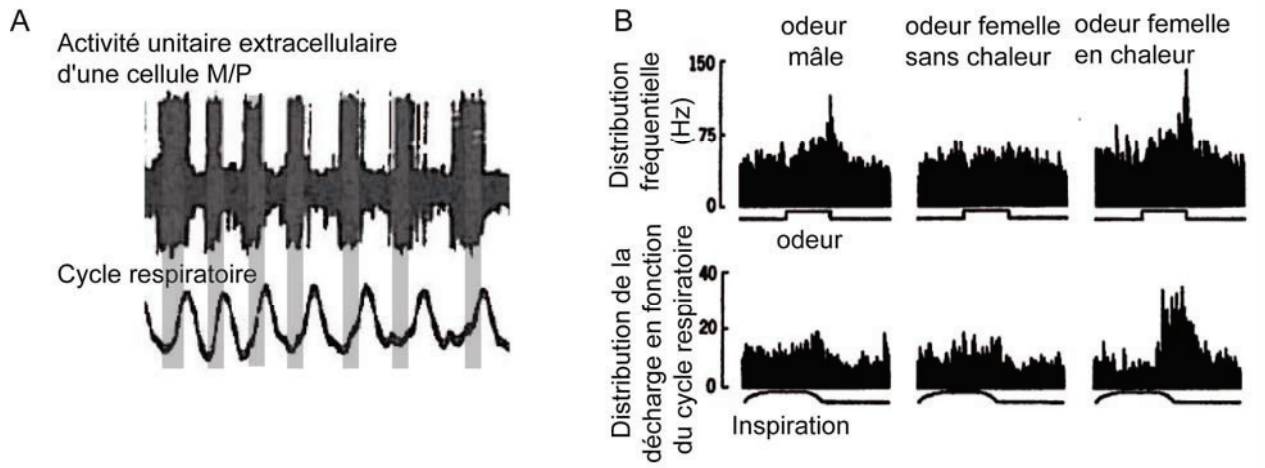


Figure 20 La décharge des cellules M/P est caractérisée par leur relation avec la respiration. A) tracé du haut : enregistrement de l'activité unitaire extracellulaire d'une cellule M/P en réponse à une odeur chez le lapin éveillé. Tracé du bas : cycles respiratoires. On peut voir nettement (traits gris) que la décharge des cellules M/P est liée à la respiration. Cette cellule, par exemple, décharge de façon spécifique à la fin de l'inspiration. D'après Chaput et Holley, 1980. B) En haut- Distribution de la fréquence de décharge d'une cellule M/P (souris sylvestre anesthésiée) en fonction des périodes avec ou sans stimulation odorante. On retrouve la réponse d'une cellule à 3 odeurs : odeur de mâle, odeur de femelle en dehors de sa période de chaleur et odeur de femelle en chaleur. Dans cette représentation, quelle que soit l'odeur, la cellule présente une faible inhibition à l'arrivée de l'odeur puis un rebond d'activité à la fin de l'odeur. Il n'y a donc pas de spécificité de la fréquence de décharge en fonction de l'odeur. En revanche si l'activité des cellules est représentée non pas en fonction du temps mais par rapport au cycle respiratoire, on peut observer une spécificité des réponses. Chaque histogramme représente la sommation de plusieurs cycles respiratoires. D'après Macrides et Chorover, 1972.

En 1992, Chaput *et al.* firent une description extensive des patterns de décharge des cellules M par rapport au cycle respiratoire (Fig. 21). On a tout d'abord les activités dites activités synchronisées simples, c'est-à-dire que les cellules présentent soit une augmentation soit une diminution de leur décharge à un moment spécifique du cycle respiratoire, le plus souvent à la transition entre l'inspiration et l'expiration. On retrouvera les activités synchronisées

excitatrices lorsque la décharge augmente à un moment du cycle respiratoire. Dans le modèle de Chaput *et al.* (1992), ces activités synchronisées excitatrices sont ensuite divisées en deux sous-groupes dépendant du taux de décharge des cellules en dehors de la période d'augmentation de décharge (Fig. 21, patterns 2a et 2b). Dans les activités synchronisées simples, on retrouve les activités synchronisées inhibitrices caractérisées par une diminution ou un arrêt de la décharge à un moment spécifique du cycle respiratoire (Fig. 21, pattern 3). Certaines cellules, ne présentent pas seulement une seule augmentation (ou diminution) de leur décharge au cours du cycle respiratoire mais peuvent successivement augmenter et diminuer leur taux de décharge toujours en relation avec le cycle respiratoire. On nomme ce type d'activité : l'activité synchronisée complexe (Fig. 21, patterns 4a, 4b, 4c et 4d). On retrouvera plusieurs sous groupes dans cette catégorie. A côté de ces activités rythmées à la respiration, on retrouve également des activités de décharge qui ne sont pas synchronisées à la respiration (Fig. 21). Ces activités non rythmées à la respiration, représentent environ 42 % des activités en réponse aux odeurs et 64.45% en absence de stimulation odorante. Elles sont classées en 2 sous-groupes (1a et 1b) dépendant du taux de décharge des cellules.

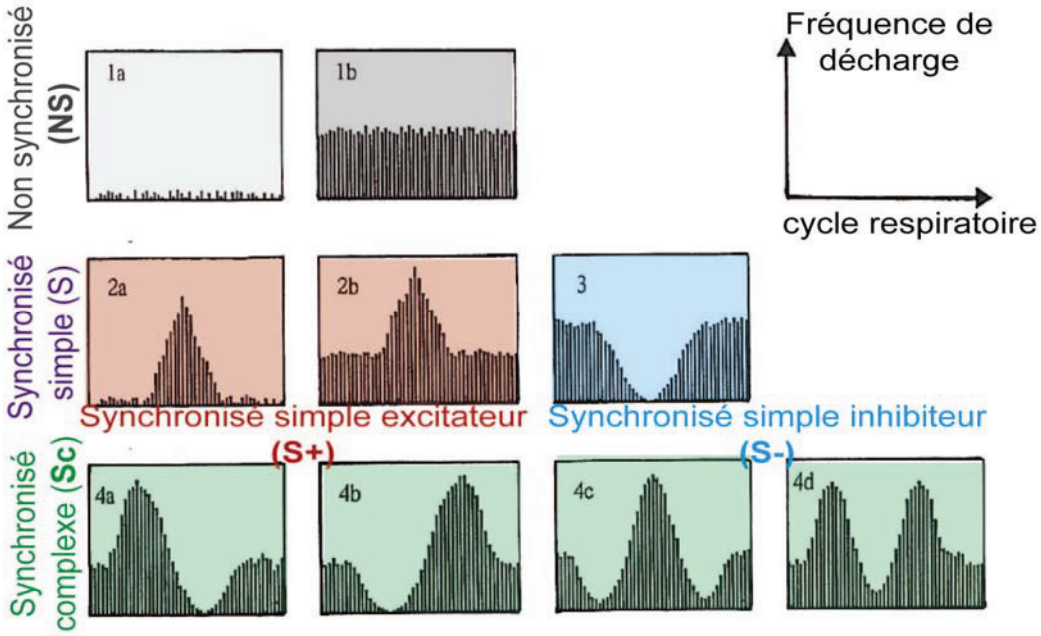


Figure 21 Illustration des différents types de patterns de décharge des cellules M/P liés à la respiration. Histogramme de distribution des potentiels d'action en fonction du cycle respiratoire. Les cellules M/P sont enregistrées en extracellulaire chez le rat anesthésié. L'axe des abscisses représente un cycle respiratoire et l'axe des ordonnées la fréquence de décharge des cellules M/P. Du haut vers le bas, on retrouve les patterns NS : non synchronisé vis-à-vis du cycle respiratoire. Dans ce groupe, on retrouve deux sous-classes en fonction du nombre de potentiels d'action. On trouve ensuite les patterns synchronisés simples présentant soit une augmentation soit une diminution de leur fréquence de décharge à une certaine phase du cycle respiratoire. On retrouve les cellules avec des activités S+ qui augmentent leur fréquence de décharge à un moment spécifique du cycle respiratoire ou les cellules avec des activités (S-) qui, elles, diminuent leur fréquence de décharge à un moment du cycle respiratoire, généralement la transition entre l'inspiration et l'expiration. Enfin on retrouve les patterns SC, c'est un ensemble qui regroupe des activités de décharge qui présentent plusieurs augmentations et diminutions de fréquence de décharge au cours du cycle respiratoire. Adapté et modifié d'après Chaput *et al.*, 1992.

Dans l'équipe (Cenier *et al.*, 2008 ; 2009) et au cours de ma thèse, nous avons utilisé une version simplifiée de cette classification (Fig. 21). Effectivement, nous avons considéré les patterns :
- S+ regroupant les activités synchronisées simples excitatrices
- S- correspondant aux activités synchronisées simples inhibitrices
- Sc regroupant l'ensemble des activités synchronisées complexes
- NS correspondant aux activités non synchronisées à la respiration
- Nul lorsque les cellules ne présentent que très peu ou pas d'activité.

Chez l'animal vigile, certains auteurs ont montré que les cellules M/P, ou en tous cas une majorité d'entre elles, perdaient leur activité en lien avec la respiration (Pager, 1985 ; Bhalla et Bower, 1997 ; Kay et Laurent, 1999 ; Rinberg *et al.*, 2006a). On peut alors légitimement se demander s'il est pertinent de s'intéresser au rythme respiratoire et si finalement l'activité rythmée des cellules M/P chez l'animal anesthésié n'est qu'une sorte d'artefact expérimental. Mais au cours des deux dernières années, différents auteurs, dont ceux-là même qui remettaient en question l'importance du rythme respiratoire chez l'animal vigile (Shusterman *et al*, 2011), ont montré que, même chez l'animal non anesthésié 1) on retrouvait une rythmicité respiratoire des cellules M/P (Cury et Uchida, 2010 ; Gschwend *et al.*, 2012) et 2) ce lien entre activité de décharge et respiration était important pour le codage des odeurs (Cury et Uchida, 2010 ; Gschwend *et al.*, 2012). Par exemple, Cury et Uchida (2010) dans une tâche de discrimination de deux odeurs chez le rat, ont enregistré à la fois la respiration et l'activité des cellules M/P. Ces auteurs montrent 1) que les cellules M/P en réponse aux odeurs redistribuent leur activité de décharge par rapport au cycle respiratoire et 2) à l'aide d'un outil statistique de classification issu du « machine learning », ces auteurs montrent que la première portion de réponse phasée à l'inspiration (dans les 100ms après l'inspiration) contient l'information sur l'odeur et est corrélée aux performances comportementales. Ces données récentes permettent donc de remettre à jour l'importance du rythme respiratoire pour l'activité des cellules M/P, ce qui avait déjà était démontré chez le lapin vigile par Chaput et Holley (1979 ; 1980) et également de montrer que ce rythme respiratoire est pertinent pour le codage des odeurs. Cela rappelle, l'étude statistique et électrophysiologique réalisée par Bathellier *et al.* (2008) chez la souris anesthésiée. Ces auteurs montraient que la discrimination d'odeurs par un ensemble de cellules M/P était possible en se basant sur leur taux de décharge sur un cycle respiratoire.

Concernant la différence entre cellules M et P, il est clair que toutes deux présentent une activité de décharge liée à la respiration. Peu de données sont disponibles à l'heure actuelle sur les différences de décharges liées à la respiration entre cellules M et P. Il semblerait toutefois, que l'on puisse distinguer les cellules M des P par leur phase préférentielle de décharge par rapport au cycle respiratoire. Par exemple, les cellules enregistrées en extracellulaire dans la couche

glomérulaire, des cellules P externes présumées, présentent en majorité des activités S+, les cellules P enregistrées dans la plexiforme externe et M, elles, ont des patterns de décharge plus divers (Buonviso *et al.*, 2003). D'autres auteurs, en réalisant des enregistrements intra-cellulaires, ont également noté une différence de phase respiratoire de décharge entre cellules M et P (Fukunaga *et al.* 2012). Ces auteurs montrent que les cellules P déchargent plus spécifiquement lors de l'expiration et les cellules M au cours de l'inspiration.

Activité du potentiel de membrane : oscillation liée à la respiration

Lorsque l'on enregistre en intracellulaire l'activité des cellules M/P, on peut avoir accès aux phénomènes sous-liminaires. La présence d'oscillations du potentiel de membrane corrélées à la respiration a été clairement démontrée (Wellis *et al.,* 1989 ; Luo et Katz, 2001 ; Cang et Isaacson, 2003 ; Margrie et Schaefer, 2003 ; Briffaud *et al.*, 2012 ; Fukunaga *et al.*, 2012). Les oscillations du potentiel de membrane liées à la respiration sont présentes en l'absence d'odeur et accentuées en présence d'odeur. Sur cette oscillation liée à la respiration, les potentiels d'action viennent se greffer lorsque les cellules sont activées (Fig. 22, à gauche). Lorsque la cellule est inhibée par l'odeur, on peut observer une hyperpolarisation globale de la cellule (composante tonique de la réponse) sur laquelle se superposent des variations de potentiel de membrane au rythme respiratoire (composantes phasiques de la réponse ; Fig. 22, à droite).

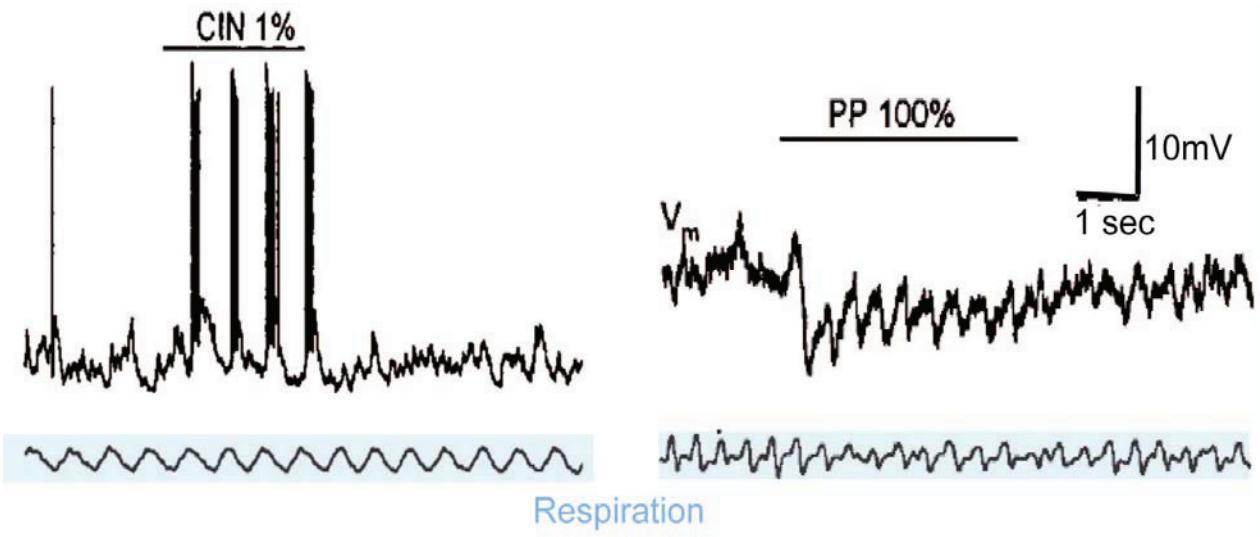


Figure 22 L'activité du potentiel de membrane des cellules M/P est aussi liée à la respiration lors des excitations mais aussi des inhibitions. A gauche, enregistrement intracellulaire d'une cellule M chez le rat anesthésié respirant librement. En bas (en bleu), on retrouve un tracé de la respiration. En réponse à l'huile de cannelle (cin 1%), cette cellule décharge et ses potentiels d'actions apparaissent à des moments précis de la respiration. De plus, on peut observer une oscillation lente du potentiel de membrane dont la fréquence est corrélée à la fréquence respiratoire. A droite, on retrouve une autre cellule M qui présente une inhibition en réponse à l'odeur de menthe poivrée (PP 100%). On peut observer que le potentiel de membrane oscille au rythme de la respiration. D'après Cang et Isaacson, 2003.

De façon intéressante, Margrie et Schaefer (2003) ont joué sur l'intensité de la stimulation, en augmentant soit la concentration de l'odeur soit en appliquant un courant d'intensité croissante dans la pipette d'enregistrement. Ils ont montré qu'en augmentant l'intensité de la stimulation, le nombre de potentiels d'action augmentait sur la phase de dépolarisation de l'oscillation du potentiel de membrane et que la latence de ces potentiels d'action était réduite vis-à-vis du début de chaque cycle d'oscillation. Ceci illustre donc l'importance que peut avoir l'oscillation lente liée à la respiration dans le codage des odeurs puisqu'elle peut être une horloge sur laquelle se cadrent les potentiels d'action.

Les oscillations du potentiel de membrane se retrouvent à la fois dans les cellules M et dans les cellules P (Charpak *et al.*, 2001 ; Phillips *et al.*, 2012 ; Fukunaga *et al.*, 2012). Il semble exister une différence entre cellules M et P. Effectivement, Fukunaga *et al.*, (2012) ont montré que les pics d'oscillations lentes des cellules M avaient une phase respiratoire différente de celles des cellules P.

1.3.3.3.3 Quelques mots sur l'activité rythmée à la respiration des interneurones

De par leur petite taille et la difficulté technique de les enregistrer, il existe peu de données disponibles *in vivo* sur l'activité en relation avec la respiration des interneurones bulbaires. Il faut tout de même souligner l'existence d'au moins deux études réalisées *in vivo* et en intracellulaire : la première de Wellis et Scott (1990) et la seconde de Cang et Isaacson (2003). Bien que les interneurones (PG et G) déchargent moins que les cellules M/P, ils peuvent décharger en lien avec la respiration. Ces études peuvent donc confirmer les présomptions d'Onoda et Mori (1980), qui avec des enregistrements extracellulaires, ont montré que des cellules enregistrées dans la couche glomérulaire et dans la couche granulaire déchargeaient en lien avec la respiration. De façon intéressante, Wellis et Scott (1990) et Cang et Isaacson (2003) ont montré la présence d'oscillations du potentiel de membrane liées à la respiration au niveau du potentiel de membrane des cellules G. Ces oscillations s'atténuent assez rapidement après les premiers cycles respiratoires contenant l'odeur.
Même avec le peu de données disponibles à ce sujet, il semble que les interneurones bulbaires possèdent eux aussi une activité rythmée par la respiration.

1.3.3.3.4 Lien entre la respiration, les oscillations du réseau et les potentiels d'action des cellules M/P

Précédemment, on a vu que l'on pouvait associer la respiration aux oscillations rapides du PCL et la respiration à l'activité de décharge des cellules M/P. Ce qui est particulièrement intéressant c'est que l'on peut également lier l'activité de décharge des cellules M/P aux oscillations rapides du PCL et ainsi faire un lien respiration, oscillations du réseau et décharge des cellules M/P.

Dans le BO de mammifère, il a été montré que les potentiels d'action des cellules M/P, aussi bien sur tranche de BO (Lagier *et al.*, 2004), qu'*in vivo* chez l'animal anesthésié (Kashiwadani *et al.*, 1999 ; Fig. 23A1, A2) ou vigile (Gschwend *et al.*, 2012), peuvent se phaser sur l'oscillation gamma. Plus spécifiquement, Cenier *et al.* (2009) ont montré que les cellules présentant une fréquence de décharge comprise entre 20 et 80 Hz pouvaient facilement se phaser à l'oscillation gamma. Or la majorité des cellules déchargeant dans cette bande de fréquence sont les cellules présentant un pattern d'activité S+. Si l'on revient à la respiration, la transition I/E est donc le moment clé où 1) l'oscillation gamma apparait, 2) les cellules présentant un pattern S+ déchargent et 3) les cellules avec un pattern S+ se phasent sur l'oscillation gamma (Fig. 23B, points jaunes). Ce phasage résulterait d'un entrainement des cellules M/P (David *et al.*, 2009) et il est probable qu'il soit également facilité par la présence d'oscillations rapides du potentiel de membrane (Desmaisons *et al.*, 1999).

Concernant les oscillations beta, moins de choses sont connues. Mais Cenier *et al*, (2009) ont pu démontrer que le phasage des potentiels d'action des cellules sur l'oscillation beta était possible uniquement lorsque la décharge des cellules était comprise entre 10 et 30 Hz. Cette condition est remplie par les cellules ayant un pattern S-. Or au moment de l'expiration, ces dernières déchargent et l'oscillation beta apparait. Là encore, à un moment spécifique du cycle respiratoire (l'expiration), le phasage entre les potentiels d'action des cellules présentant un pattern S- et l'oscillation beta est rendu possible. Ces relations entre oscillations rapides, respiration et type de décharge des cellules M/P sont synthétisées sur la figure 23B.

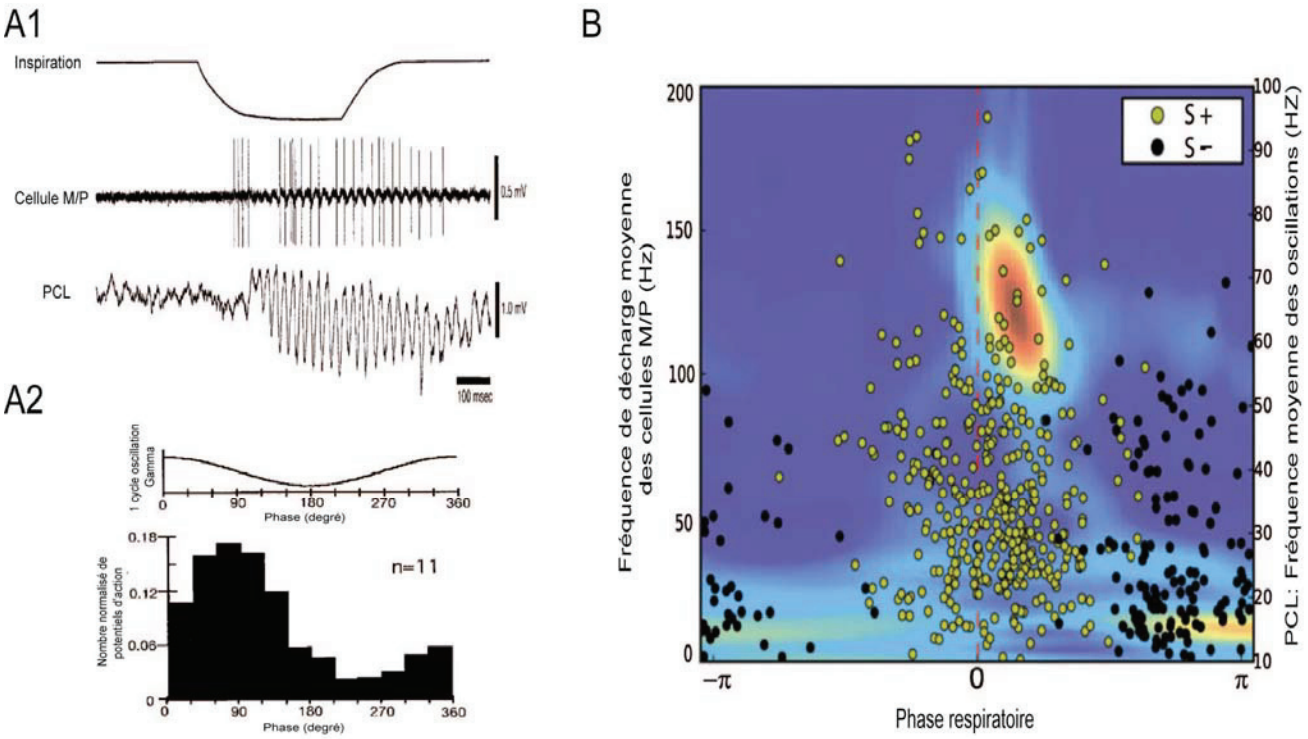


Figure 23 A) Les cellules M/P se phasent sur l'oscillation gamma. A1- Du haut vers le bas, pression négative dans la cavité nasale mimant l'inspiration, enregistrement de cellules M/P et oscillations du PCL à la fréquence gamma. Ils semblent sur A1 que les potentiels d'action de cette cellule M/P soient synchronisés à l'oscillation gamma du PCL. Ceci est confirmé sur la figure A2- où en haut, on retrouve la phase en degré de l'oscillation gamma et en bas l'histogramme de distribution des potentiels d'action par rapport à un cycle d'oscillation gamma. Figures adaptées de Kashiwadani *et al.* (1999). B) Lien entre pattern respiratoire des cellules, fréquence de décharge, oscillations rapides et respiration en réponse à une stimulation odorante. Les points représentent la phase respiratoire moyenne (pattern de décharge S+ en jaune et S- en noire) et la fréquence de décharge des cellules M/P. Chaque point correspond à une cellule. A l'arrière, une carte phase respiratoire - fréquence (ordonnée à droite) du PCL bulbaire est représentée. Plus l'oscillation est puissante plus la couleur est chaude. En abscisse, la phase respiratoire est représentée, 0 correspond à la transition entre l'inspiration et l'expiration. Figure adaptée de Cenier *et al. (*2009).

L'ensemble des activités bulbaires sont liées à la respiration, la cible majeure du BO, le cortex piriforme, présente également des activités rythmées par la respiration. Notons pour la suite, que la majorité des études décrites ci-dessous sont réalisées au niveau du cortex piriforme antérieur sauf lorsque précisé.

1.3.3.4 La sortie du BO : l'activité du cortex piriforme est aussi rythmée par la respiration

Lorsque l'on enregistre l'activité oscillatoire du cortex piriforme, on va retrouver une rythme lent lié à la respiration (Woolley et Timiras, 1965; Fontanini *et al.*, 2003 ; Neville et Haberly, 2003 ; Litaudon *et al.*, 2008). Superposées à ce rythme lent, tout comme dans le BO, on retrouve

des oscillations gamma, précisément à la transition inspiration-expiration (Woolley et Timiras, 1965[2] ; Bressler, 1984 ; Bressler, 1987 ; Litaudon *et al.*, 2008).
Concernant les activités unitaires, il a été montré qu'elles présentaient une activité de décharge rythmée par la respiration (Wilson, 1998 ; Fontanini *et al.*, 2003 ; Litaudon *et al.*, 2003). Litaudon *et al.* (2003) ont confirmé cette rythmicité à la fois dans le cortex piriforme antérieur et dans le cortex piriforme postérieur. Toutefois, ces auteurs ont noté une différence entre ces deux structures : les cellules du cortex piriforme antérieur répondent aux odeurs avec une augmentation de la fréquence décharge au moment de la transition inspiration-expiration alors que celles du cortex pirforme postérieur présentent une augmentation de la fréquence de décharge soit pendant l'inspiration soit pendant l'expiration.
Les enregistrements intracellulaires *in vivo* ont également permis de démontrer la présence d'oscillations du potentiel de membrane au rythme respiratoire (Wilson, 1998 ; Fontanini *et al.*, 2003).
Au-delà du BO, l'information olfactive contient donc encore une empreinte très marquée de la respiration.

1.3.4 Respiration et perception olfactive

Nous venons de décrire l'impact de la respiration sur la physiologie du réseau olfactif. Nous allons maintenant voir les conséquences fonctionnelles de l'échantillonnage des odeurs par la respiration. C'est-à-dire nous allons décrire l'impact de la respiration sur la perception olfactive.

1.3.4.1 La perception en un cycle respiratoire

Chez l'Homme (Laing, 1983 ; 1986) ainsi que chez l'animal (Uchida et Mainen, 2003), la perception et même la discrimination d'odeurs sont possibles en un cycle respiratoire. Déjà le Dr. Proetz (1941) suggérait qu'une seule inspiration, même faible, pouvait permettre la perception olfactive chez l'Homme. Effectivement dans une expérience où les sujets devaient rester en apnée, le Dr. Proetz nota « qu'une seule petite respiration était requise pour enregistrer une impression olfactive ». Plus récemment, chez l'Homme, Laing (1983, 1986) a montré qu'une identification était possible en un cycle respiratoire. En demandant à ses sujets de prendre 1, 3, 5 ou 7 sniffs (inspiration et expiration) pour échantillonner une odeur et décrire l'intensité de l'odeur, Laing a montré que le premier sniff contenait autant d'information sur la présence et l'intensité de l'odeur que le sujet ait pris 1, ou plus de sniffs.
Chez l'animal, à qui on ne peut donner la consigne de respirer de telle ou telle façon, Neuhaus (1981) puis Goldberg et Moulton (1987) ont été les premiers à suggérer la rapidité de la

[2] *Dans cet article les auteurs notent Beta un rythme de 50 Hz, que je considère ici être du gamma.*

discrimination olfactive. Effectivement, ces auteurs ont montré que le rat était capable de déterminer la présence d'une odeur (l'isoamyl acétate versus de l'air uniquement) en moins d'une seconde. Plus récemment, dans une étude comportementale aux paramètres très contrôlés, Uchida et Mainen (2003) ont montré qu'un rat pouvait réaliser une discrimination entre deux odeurs en un seul cycle respiratoire. Les auteurs ont tout d'abord observé que les animaux discriminaient très rapidement les odeurs : en 223 ms en moyenne. En enregistrant la respiration de l'animal à l'aide de capteurs de température implantés dans la cavité nasale, les auteurs ont montré que les animaux discriminaient les deux odeurs en un sniff. C'est-à-dire qu'un sniff peut, comme chez l'Homme, contenir l'information sur l'identité de l'odeur. Il faut noter que les rats utilisés dans l'étude d'Uchida et Mainen (2003) étaient des rats hyper-entrainés (4 rats et 33 948 essais réalisés), la tâche n'était donc plus difficile pour eux. Or lorsque la tâche devient difficile pour les animaux, ils doivent prendre plus d'un cycle respiratoire. C'est ce qu'ont notamment démontré Abraham *et al.* (2004). Ces auteurs ont utilisé une tâche de discrimination entre deux odeurs dans un test de Go/no Go dans laquelle ils ont joué sur la difficulté de la tâche. Ils ont utilisé une discrimination facile, lorsque l'animal doit discriminer deux odeurs mono-moléculaires (par exemple : le cinéole versus l'eugénol ou encore l'amyl acétate versus l'éthyl butyrate) et des discriminations difficiles en utilisant des mélanges binaires de ces odeurs, par exemple les souris doivent discriminer deux mélanges : le premier contient 60% d'ethylbutyrate et 40% d'amyl acétate et le second 40% d'éthylbutyrate et 60% d'amyl acétate. Lorsqu'ils utilisent des odeurs dans des mélanges proches, l'animal prend plus de temps et donc plus de cycles respiratoires pour discriminer. C'est ce que Rinberg *et al*. (2006b) ont appelé le compromis entre difficulté de la tâche et temps pour la réaliser. Quand bien même, dans les tâches difficiles, l'animal doit prendre plus d'un cycle respiratoire, le système olfactif a tout de même la possibilité de discriminer des odeurs en un cycle respiratoire. Comme proposé par Uchida et Mainen (2003), un cycle respiratoire représenterait un « instantané » pertinent de l'environnement olfactif et formerait l'unité pour le traitement de l'information olfactive (Pour revue, Kepecs *et al.*, 2006). Ceci coïncide parfaitement avec le fait que l'ensemble des activités neuronales olfactives sont liées à la respiration et que certains auteurs ont montré que lorsque la décharge des cellules M/P était prise en compte avec la base de temps d'un cycle respiratoire, elle permettait à des outils statistiques de classification de déterminer l'odeur présentée (Lehmkhule *et al.*, 2006 ; Bathellier *et al.*, 2008). Plus précisément, Lehmkhule *et al.*, (2006), chez le rat anesthésié, a présenté six odeurs différentes, dont des énantiomères (par exemple, les enantiomères du limonène), et a en parallèle enregistré l'activité de plusieurs cellules M/P. Ces auteurs montrèrent, en utilisant un algorithme, qu'il était possible de discriminer de façon correcte plusieurs stimuli odorants à partir de la décharge des cellules M/P lorsque leurs réponses étaient intégrées sur l'ensemble d'un cycle respiratoire.

1.3.4.2 Les variations de dynamique respiratoire affectent la perception olfactive

C'est le flux d'air respiratoire qui conduit les molécules odorantes dans la cavité nasale. Dès lors que l'on modifie ce flux d'air par sa force, son débit, sa fréquence…, on influence la quantité et la rapidité des molécules pénétrant dans la cavité nasale. Chez l'Homme, différents auteurs ont proposé des protocoles dans lesquels ils demandaient à leur sujet de jouer sur leur respiration et comparaient alors la perception olfactive dans différentes conditions respiratoires. Une des premières études à considérer l'importance des modulations de respiration pour la perception olfactive a été réalisée par Le Magnen (1944). Ses travaux pionniers, sur l'Homme, ont permis de montrer que la vitesse et le débit du sniff influençaient la perception d'une même odeur. Par exemple, une augmentation de la vitesse de sniff peut augmenter l'intensité de l'odeur perçue. Rehn (1978) demanda à ses sujets de prendre des inspirations plus ou moins fortes et montra une augmentation de la perception de l'intensité de l'odeur avec une plus forte inspiration. Laing (1983) réalisa le même type d'études en demandant à ses sujets de prendre un sniff faible, naturel ou profond (fort). Il observa que l'intensité de l'odeur perçue était plus forte lorsque le sujet prenait un sniff naturel ou fort par rapport au sniff faible. La façon dont on va respirer une odeur va conditionner notre perception olfactive. Dans les études énumérées ci-dessus, les auteurs donnaient une consigne à leurs sujets afin de faire varier la respiration et regarder les corrélats sur la perception. Sans consigne, naturellement, chez les Hommes et les animaux, la respiration ou flairage est un acte très dynamique.

1.3.4.3 Le flairage est un acte dynamique

Différents auteurs ont démontré, en utilisant différentes techniques comme les enregistrements audio, vidéo, les canules implantées dans la cavité nasale ou la phéthysmograhie corps entier, que le flairage était hautement dynamique (Fig. 24). Cette variabilité de la dynamique respiratoire a été décrite chez plusieurs espèces: le chien (Moulton et Marshall, 1976), le rat (Welker, 1964 ; Teichner, 1966 ; Youngentob *et al.,* 1987 ; Walker *et al.*, 1997 ; Wesson *et al.*, 2009), la souris (Wesson *et al.*, 2008b), le lapin (Freeman *et al.,* 1983), l'Homme (Rehn, 1978 ; Teghtsoonian et Teghtsoonian, 1982) et même des animaux plus « exotiques », comme le *tupaia Belangeri* (petit mammifère arboricole du sud-est asiatique ; Holst et Kolb, 1976). Les modifications les plus évidentes de la dynamique de flairage concernent la fréquence et l'amplitude ou débit du signal (Fig. 24).

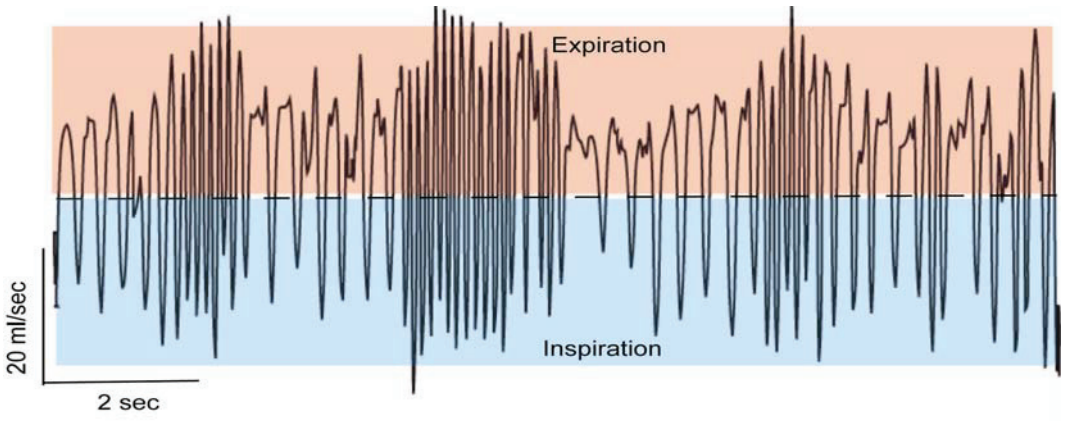


Figure 24 Tracé personnel illustrant la variabilité de la respiration tant en terme de fréquence que d'amplitude. En bleu, on a les phases inspiratoires et en rouge, les phases expiratoires.

D'autres paramètres respiratoires peuvent néanmoins être mesurés. Youngentob *et al.*, (1987) en ont qualifié 52. Ces auteurs souhaitaient avoir des indices pertinents leur permettant de quantifier les variations de paramètres respiratoires variant avec les stimuli odorants. Sur les 52 décrits, ils ont pu montrer, grâce à des outils statistiques, que 12 paramètres du cycle respiratoire étaient pertinents pour définir les patterns respiratoires en réponse à des stimuli odorants. Ces 12 paramètres sont récapitulés dans le tableau 1. Ce qui est important de noter, c'est qu'un animal ne fait pas seulement varier la durée de la période d'échantillonnage ou le nombre de cycles pris, mais les paramètres intrinsèques au cycle respiratoire sont également variables. Cela est vrai à la fois pour les phases d'inspiration et d'expiration. Effectivement, on retrouve des modifications de la durée d'inspiration, des débits moyens d'inspiration et d'expiration, du débit maximal d'inspiration ou encore de volumes (Tableau 1).

De nombreux travaux ont rapporté que le flairage pouvait varier de façon spontanée, en fonction de l'état de l'animal ou de la tâche comportementale (Clarke et Trowill, 1971 ; Deschênes *et al.*, 2012). Un premier exemple de variation de la fréquence respiratoire est celui de l'habituation: quand une nouvelle odeur est présentée, la fréquence respiratoire augmente, puis diminue lorsque la présentation de l'odeur est répétée (Holst et Kolb, 1976 ; Wesson *et al.*, 2008b ; Johnson *et al.*, 2010). Un second exemple intéressant est celui de la variation de fréquence liée à l'anticipation. Dans une tâche de discrimination, le rat doit d'abord renifler l'odeur, donner une réponse comportementale et ensuite recevoir une récompense. Kepecs *et al.* (2007) ont montré qu'en moyenne la respiration de l'animal lors de l'échantillonnage des odeurs était d'environ 8 Hz alors qu'elle était augmentée à 10-11 Hz lorsque l'animal anticipait la récompense. Le passage entre ces deux bandes de fréquence se fait extrêmement rapidement : en un cycle respiratoire. L'augmentation de fréquence lors de l'attente de la récompense avait déjà été décrite par Clarke *et al.* (1970 ; Clarke et Trowill, 1971). Cela est certainement à relier à l'observation que la stimulation électrique de certaines zones des circuits de la récompense (hypothalamus latéral et aire tegmentale ventrale) génère un flairage (Clarke et Trowill, 1971 ;

Waranch et Terman, 1975 ; Rossi et Panksepp, 1992 ; Ikemoto et Panksepp, 1994). Le flairage semble aussi lié aux états d'attention de l'animal (Alberts et May, 1980). En lien avec ce niveau d'attention, Wesson *et al.* (2008b) ont montré que le flairage était variable en fonction de la tâche comportementale dans laquelle l'animal était engagé.

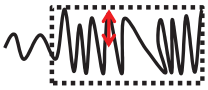
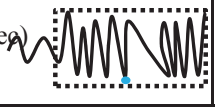
Les différents paramètres respiratoires		
Durée de la période de flairage (ms) 	Nombre d'inspirations dans la période de flairage(ms) 	Durée d'une inspiration (ms) 
Volume inspiratoire (ml) 	Volume expiratoire (ml) 	Débit moyen d'une inspiration (ml/sec) 
Débit moyen d'une expiration (ml/sec) 	Volume inspiratoire total sur la durée du flairage (ml) 	Volume maximum inspiratoire (ml) 
Volume net d'échange d'air (ml) 	Pic de débit maximum de l'inspiration (ml/sec) 	Débit moyen de l'inspiration maximale (ml/sec) 

Tableau 1 Table représentant les différents paramètres respiratoires pouvant significativement varier selon Youngentob *et al.* (1987) lors de la présentation d'une odeur. En noir est représenté un exemple de tracé respiratoire. En rouge, les paramètres concernent l'expiration, et en bleu l'inspiration.

La respiration/ flairage est donc un acte très dynamique et ses variations peuvent avoir un impact capital. On a pu notamment voir comment la modulation de l'échantillonnage pouvait affecter la perception (paragraphe 1.3.4.2). Réciproquement, il semble probable que le système olfactif puisse contrôler les variations de dynamique respiratoire que l'on vient de voir.

1.3.4.4 Contrôle et modulation de l'acte moteur respiratoire par le système olfactif

Il a été proposé que le flairage puisse être modulé par le système olfactif. Ces modulations serviraient à augmenter la perception olfactive et seraient liées à l'intensité (la quantité) du stimulus, à son hédonicité et à sa qualité (définie par les propriétés physico-chimiques des molécules odorantes). A l'heure actuelle, concernant la qualité du stimulus, rien n'a été clairement démontré. La majorité des études montre une relation entre intensité de l'odeur et adaptation du sniff. Ainsi, chez le rat vigile, Youngentob *et al.* (1987) a réalisé une analyse très détaillée de la respiration. Cet auteur a montré qu'un animal adaptait sa respiration en fonction de la concentration des molécules odorantes. Si le rat est confronté à une odeur faiblement concentrée, il augmente son débit d'inspiration (Fig. 25A). De même, Moulton et Marshall (1976)

ont montré que le chien augmente la durée de son cycle respiratoire face à une odeur faiblement concentrée. De plus, il peut également augmenter le nombre de respirations prises lorsque l'odeur est faiblement concentrée (Teichner, 1966). Chez l'homme, Laing (1983,1986) a montré une augmentation de la durée du cycle respiratoire lorsque les sujets sont confrontés à des odeurs faiblement concentrées. Jonhson *et al.*, (2003) ont également montré une adaptation du débit de l'inspiration en fonction de la concentration des molécules odorantes. Mais la principale découverte de ces auteurs est que l'adaptation de la respiration est très rapide. Effectivement, le sujet humain fait varier son débit d'inspiration de 150 à 260 ms après la présentation de l'odeur (Fig. 25B).

Enfin, Bensafi *et al.*, (2003, 2005) ont montré que lorsqu'on proposait aux sujets de s'imaginer une odeur déplaisante, ces derniers diminuaient fortement leur respiration.

Ainsi, la respiration peut être adaptée en fonction de certaines caractéristiques des odeurs (concentration et hédonicité).

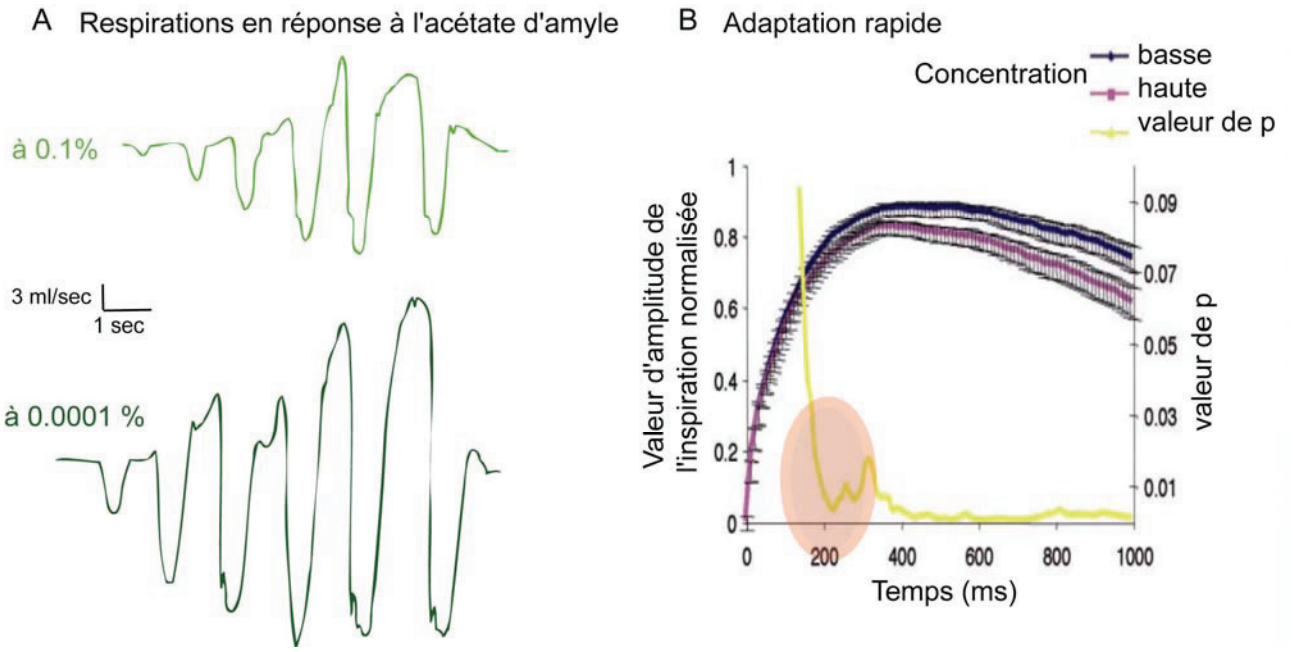


Figure 25 A) Tracés bruts de respirations de rats en réponse à la présentation de l'acétate d'amyle à deux concentrations, l'une forte (haut, vert clair), l'autre faible (bas, vert foncé). Figure adaptée de Youngentob *et al.* (1987). B) Amplitude de l'inspiration normalisée, chez l'Homme, en fonction du temps et de la concentration de l'odeur (violet et rose, respectivement basse et forte concentrations). 0 représente le début de la stimulation odorante. L'axe des ordonnées à droite représente la valeur de p (jaune) pour la comparaison de l'amplitude de la respiration entre les 2 concentrations et en fonction du temps. On voit que cette valeur devient significative à partir de 150-200ms (rond rouge). D'après Johnson *et al.* (2003).

1.4 Position du problème : Impacts des variations de flairage sur l'activité du système olfactif et sur la discrimination olfactive

1.4.1 Contexte général

L'activation de l'EO par les molécules odorantes est déterminée par deux facteurs : l'un inhérent qui tient à la répartition topographique et la sensibilité des neurorécepteurs olfactifs et l'autre imposé par la migration des molécules dans la cavité nasale lors de l'inspiration. Or la respiration est un acte dynamique (Youngentob *et al.,* 1987). En engendrant des variations de flux d'air dans la cavité nasale, les variations des paramètres respiratoires modifient la migration des molécules odorantes le long de l'EO (Fig. 26A). Ces modifications, modélisées par différents auteurs à la fois chez l'homme (Keyhani *et al.*, 1997 ; Ishikawa *et al.*, 2009), chez le chien (Craven *et al.*, 2009) et chez le rat (Yang *et al.*, 2007 ; Jiang et Zhao, 2010 ; Kimbell *et al.*, 1997), sont dépendantes des propriétés physico-chimiques des molécules odorantes. Par exemple, une augmentation de débit d'air a pour conséquence d'augmenter la migration des molécules très solubles alors qu'elle diminue celle des molécules peu solubles (comme l'octane, Fig. 26A ; Keyhani *et al.*, 1997). Ces variations de migrations couplées au pattern inhérent aboutissent à une modification de l'activation spatiale de l'EO spécifique de l'odeur utilisée (Etudes d'EOG : Ezeh *et al.*, 1995 ; Scott-Johnson *et al.*, 2000 ; Scott *et al.,* 2006 ; Etude d'imagerie :Kent *et al.*, 1996 ; Fig. 26B).

A cause de la spécificité des projections épithélio-bulbaires, les changements observés au niveau épithélial devraient en partie se retrouver au niveau de la carte d'activation bulbaire et des réponses temporelles. A ce jour, peu d'études sont disponibles. Au niveau des cartes d'activation glomérulaire, Oka *et al.* (2009) ont démontré leur sensibilité au débit d'air passant dans la cavité nasale. Au niveau de la dynamique temporelle, la fréquence respiratoire semble altérer fortement l'activité temporelle de l'entrée bulbaire à la fois chez l'animal anesthésié (Spors *et al.*, 2006) et chez l'animal vigile tête-fixée (Verhagen *et al.*, 2007 ; Wesson *et al.*, 2008a ; 2009 ; Carey *et al.*, 2009).

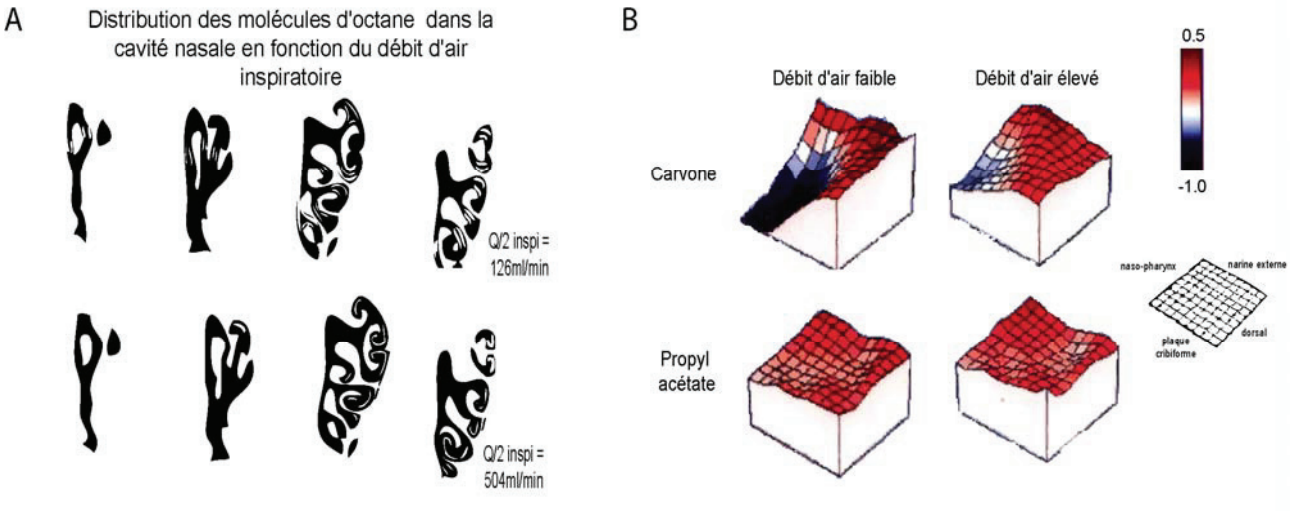


Figure 26 Impact des variations de paramètres respiratoires sur la migration des molécules et l'activation de l'EO. A) Le débit affecte la migration des molécules odorantes dans la cavité nasale. Coupes transversales de cavité nasale de rat (de gauche à droite, coupes transversales de l'avant vers l'arrière de la cavité nasale). Les 4 coupes ont été prises selon l'axe antéro-postérieur (voir Fig. 13 et 14). En haut lorsque le débit est faible, en bas lorsqu'il est élevé. Les traits blancs (sur fond noir) représentent les zones de l'EO où se sont déposées les molécules odorantes. On voit que la migration de cette molécule est différente selon le débit d'air appliqué. Figure adaptée de Yang *et al.* (2007). B) Variations spécifiques du pattern d'activation de l'EO en fonction des variations de débit et de l'odeur utilisée. Représentation de l'amplitude relative (par rapport à une réponse à une odeur de base) des réponses enregistrées avec une technique d'imagerie avec un marqueur voltage-dépendant. Les valeurs logarithmiques des ratios varient de -1.0 à 0.5 (échelle de couleur de bleu à rouge). Ces activités sont représentées sur la surface des cornets (carrés) en fonction des odeurs et du débit. Et l'on voit que le débit affecte le pattern de réponse de l'EO à la carvone. Cette modulation est beaucoup moins forte avec le propyl acétate. Figure adaptée de Kent *et al*. (1996).

1.4.2 Questions posées

1.4.2.1 Quels sont les effets des variations de paramètres respiratoires sur l'activité bulbaire ?

Aucune étude, à ce jour, n'a caractérisé de façon systématique les effets de la fréquence ET du débit sur l'activité de sortie du BO. Or ces paramètres modifient profondément l'activité de l'EO et de l'entrée bulbaire. J'ai donc choisi d'étudier l'impact des variations des paramètres de la respiration (débit et fréquence) sur 1) l'activité du réseau bulbaire, par l'étude des PCL, 2) l'activité de sortie bulbaire par l'étude de l'activité unitaire des cellules M/P. J'ai étudié cet impact à la fois en absence d'odeur et en réponse à une stimulation odorante.

Cette question a été abordée en deux volets. Dans le premier (étude 1), nous avons souhaité définir l'effet de variations de débit respiratoire sur l'activité du BO puisqu'il n'y avait pas de données disponibles concernant l'impact des variations de débit respiratoire sur la dynamique temporelle du BO.

Dans un deuxième volet (étude 2), nous avons testé les effets conjoints de la fréquence et du débit sur l'activité bulbaire. En effet le volume respiratoire est conditionné à la fois par la fréquence et le débit: une augmentation de fréquence conduit à une diminution du volume alors qu'au contraire, une augmentation de débit entraîne l'augmentation du volume. Nous nous sommes donc posé la question du résultat de cet antagonisme sur l'activité bulbaire.

1.4.2.2 Conséquences fonctionnelles: quelle est l'utilité des variations de flairage pour l'animal qui se comporte ?

Après avoir démontré que les variations de flairage affectaient l'activité du premier relais de l'information odorante, nous nous sommes demandé à quoi pouvaient servir ces variations chez l'animal qui se comporte, puisque ce rôle n'a jamais été démontré. De façon générale, nous pensons que le flairage est le reflet d'un acte olfacto-moteur. Par conséquent, il peut être adapté de façon rapide afin d'augmenter la perception/discrimination des odeurs. En lien avec la littérature (Schoenfeld et Cleland, 2005 ; 2006), nous avons posé l'hypothèse fonctionnelle que ces variations de flairage serviraient à optimiser le transport de différentes molécules odorantes sur les zones de l'épithélium les plus aptes à les recevoir (les plus sensibles). On sait également que les variations de paramètres respiratoires peuvent modifier la migration des molécules odorantes le long de l'EO en fonction de leurs propriétés (Yang *et al.*, 2007). Nous avons donc voulu tester si un animal pouvait adapter son flairage en fonction des molécules odorantes et notamment de leurs propriétés physico-chimiques, afin d'optimiser leur migration le long de l'EO dans le but d'améliorer sa discrimination olfactive (étude 3).

2 MATERIELS ET METHODES

Le but de ce court chapitre est de résumer les principales méthodes utilisées au cours de ma thèse. Les détails de chacune des méthodes utilisées peuvent être retrouvés dans Courtiol *et al.* (2011a ; b) et dans la dernière partie des résultats en ce qui concerne l'analyse de la respiration chez un animal réalisant une tâche comportementale.

2.1 Découpler le flux d'air nasal de la respiration de l'animal et le contrôler (études 1-2)

2.1.1 Double canulation chez le rat anesthésié

Nos deux premières questions portaient sur les effets des variations de flux d'air sur l'activité du BO. Pour répondre à ces questions, il nous fallait pouvoir contrôler précisément le flux d'air circulant dans la cavité nasale. Pour cela, nous avons élaboré une technique de trachéotomie avec double canulation, chez l'animal anesthésié (uréthane). Notre but étant uniquement d'étudier l'effet de la respiration sur l'activité bulbaire (effet bottom-up) et de contrôler avec précision les flux d'air dans la cavité nasale, le modèle anesthésié était bien adapté.
Une incision était pratiquée au niveau du cou et la trachée dégagée. Un premier cathéter (canule trachéale) placé dans la trachée en direction des poumons, permettait au rat de respirer librement. Le second, également placé dans la trachée en direction de la cavité nasale (canule nasale), nous permettait d'imposer l'air dans la cavité nasale (Fig. 27).
Deux capteurs (débitmètre bidirectionnel, AWN2000 family, N switch Honeywell) nous permettaient de mesurer les différents flux: l'un placé devant la canule trachéale mesurait l'activité respiratoire de l'animal, l'autre placé devant le nez du rat recueillait le flux d'air imposé dans la cavité nasale. Un schéma récapitulatif du système est présenté sur la figure 27.

2.1.2 Contrôle de l'air passant dans la cavité nasale

Une fois la double canulation réalisée, il fallait pouvoir faire circuler de l'air dans la canule nasale. La plupart des études utilisant le protocole de double canulation, appliquent uniquement des pressions négatives mimant seulement l'inspiration. Afin de reproduire au mieux les conditions physiologiques, nous avons voulu imposer à la fois des pressions négatives pour mimer les phases inspiratoires et des pressions positives reproduisant les phases expiratoires. Cela a été rendu possible par la mise au point d'un simulateur de cycles respiratoires par l'équipe "Recherche et Développement" du laboratoire (fonctionnant sous Labview). Ce

simulateur nous permettait de délivrer un flux d'air *via* la canule nasale (Fig. 27) de différentes façons:

- Soit en reproduisant exactement la respiration de l'animal recueillie à la sortie de la trachée. Nous pouvions alors faire varier la différence de phase entre la respiration de l'animal et celle imposée dans la cavité nasale
- Soit en supprimant l'air dans la cavité nasale
- Soit en modifiant les paramètres de la respiration imposée en fréquence et/ou en débit.

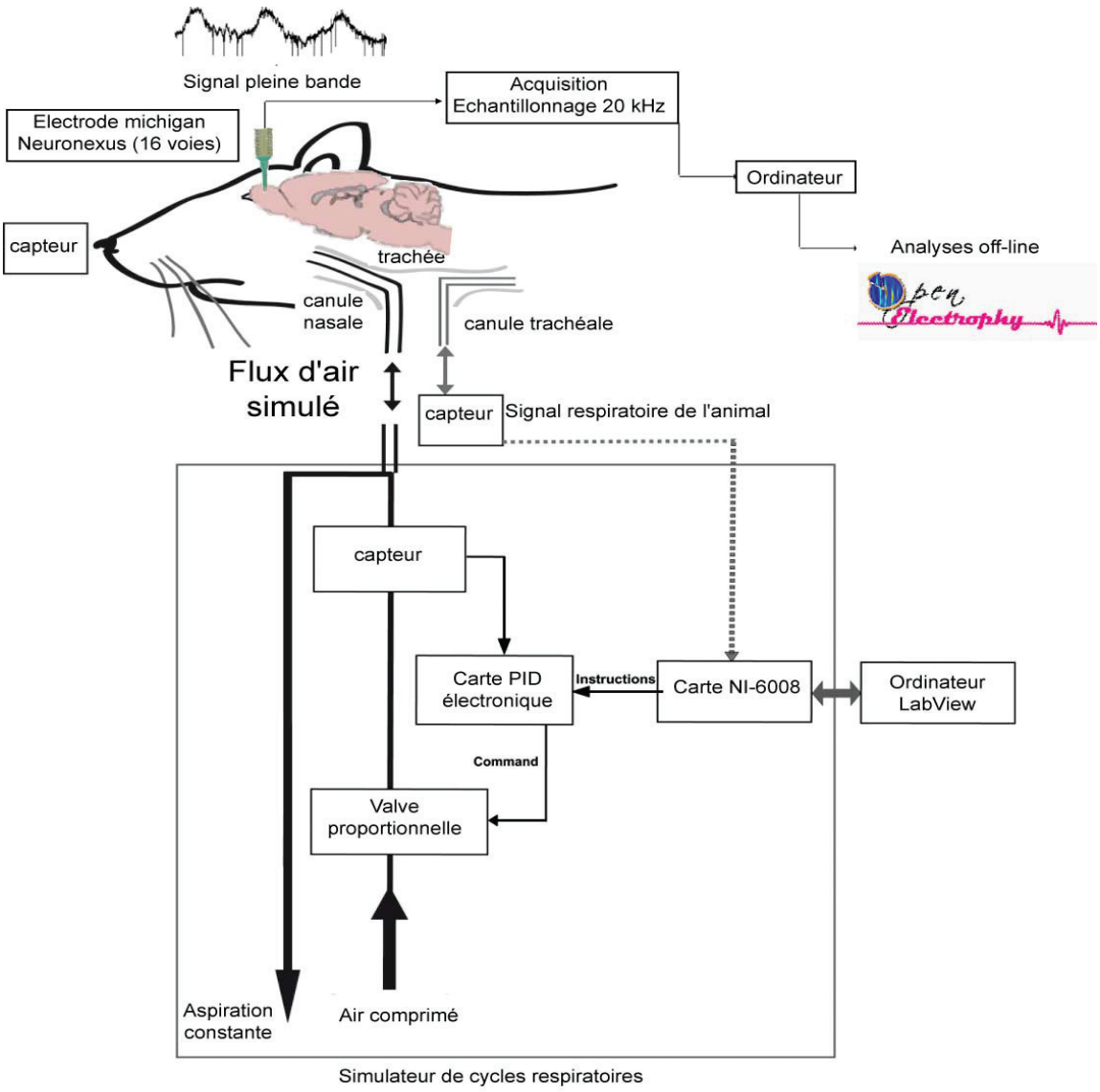


Figure 27 Schéma représentant le dispositif de double canulation chez l'animal anesthésié à l'uréthane. En bas, on voit la représentation du simulateur de cycles respiratoires avec ses différents composants. Ce simulateur nous permet d'envoyer un flux d'air simulé dans la cavité nasale, *via* la canule nasale. En haut du schéma, l'activité du BO est enregistrée en parallèle avec des électrodes multi-sites (électrode Michigan 16 voies, NeuroNexus) nous permettant de recueillir les activités unitaires et oscillatoires. Les signaux sont ensuite traités par un logiciel : OpenElectrophy.

2.2 Les signaux électrophysiologiques chez l'animal anesthésié (études 1-2)

2.2.1 Enregistrer l'activité bulbaire chez l'animal anesthésié (études 1-2)

Notre but dans les deux premières études était d'étudier l'effet du flux d'air et de ses variations sur l'activité bulbaire. Nous souhaitions avoir accès à la fois à l'activité du réseau et à l'activité unitaire des cellules M/P.

Nous avons utilisé des électrodes de silicium avec 16 voies d'enregistrement espacées de 50 micro mètres réparties linéairement (NeuroNexus Technologies, Ann Arbor, MI). L'impédance de chaque point d'enregistrement était comprise entre 0,8 et 1,5 MΩ. Cette électrode multisite nous permettait d'acquérir non seulement l'activité oscillatoire d'une partie du bulbe mais également l'activité unitaire extracellulaire des cellules M/P puisque nous enregistrions le signal pleine bande (0-3000hz) et l'acquérions à 20 kHz (Fig. 27).

En plus des signaux électrophysiologiques, les signaux respiratoires et les signaux de début et de fin d'odeur délivrée par l'olfactomètre, ont été enregistrés.

2.2.2 Les outils pour analyser les données électrophysiologiques

Nous nous intéressions à la fois à l'activité unitaire des cellules M/P, l'activité oscillatoire du BO (oscillations beta et gamma) et surtout à la relation de ces événements avec la respiration. L'activité bulbaire est en effet caractérisée par sa relation avec la respiration, notamment avec certaines phases de la respiration comme la transition entre l'inspiration et l'expiration. Le laboratoire a donc travaillé en collaboration avec des physiciens pour réaliser un logiciel permettant : 1) la détection des différentes phases de la respiration; 2) la détection des potentiels d'actions extra-cellulaires et 3) la détection des bouffées oscillatoires beta et gamma (Roux *et al.*, 2006 ; 2007 ; Buonviso *et al.*, 2003 ; Cenier *et al.* ; 2008 ; 2009 ; Garcia et Fourcaud-Trocmé, 2009). Ainsi, l'ensemble des données acquises ont été enregistrées et transférées dans une base de données SQL. Nous avons utilisé un logiciel réalisé au laboratoire : OpenElectrophy. C'est un logiciel libre d'accès fonctionnant sous python, disponible sur http ://neuralensemble.org/trac/OpenElectrophy. La manière dont il fonctionne est décrite dans Garcia et Fourcaud-trocmé (2009). OpenElectrophy permet la détection et le stockage dans une base de données (SQL) de différents événements :

- le début et fin des phases inspiratoires et expiratoires
- le temps de chaque potentiel d'action

- la fréquence, durée, phase et énergie de chaque bouffée d'oscillations.

Toutes les données ainsi stockées, peuvent être récupérées à l'aide de scripts écrits sous python. On peut alors calculer tous les paramètres nécessaires au traitement des données, caractériser la phase des différents événements électrophysiologiques par rapport à la respiration, calculer la fréquence de décharge des cellules M/P… Les détails de ces traitements sont donnés dans les publications (Roux *et al.*, 2006 ; 2007 ; Cenier *et al.*, 2008 ; 2009).

2.3 Enregistrer la respiration chez un animal impliqué dans une tâche de discrimination olfactive (étude 3)

2.3.1 Enregistrer la respiration chez un animal vigile

Le dernier volet de ma thèse porte sur l'étude de la respiration chez un animal vigile. Nous souhaitions perturber le moins possible le comportement respiratoire de l'animal. Nous avons choisi et mis au point une technique d'enregistrement non invasive en collaboration avec une société (EMKA technologies). Nous avons choisi une cage de pléthysmographie pour animal entier. Cette cage complètement hermétique, est dotée d'un capteur de pression différentielle mesurant une différence de pression entre la chambre où est placé l'animal, et une chambre vide (Fig. 28A). Nous avions également besoin de faire circuler de l'air (puisque nous devions délivrer des odeurs). L'air et les odeurs étaient délivrés *via* un olfactomètre. Pour garder une pression constante dans la cage, le même débit d'air était aspiré par une pompe.
Les données du capteur de pression différentielle sont amplifiées, échantillonnées à 1kHz et enregistrées grâce à un logiciel mis au point au laboratoire Neurolascope, *via* une carte d'acquisition (MC-1608FS, Measurement Computing, Norton, MA).

2.3.2 Le choix d'une tâche de discrimination olfactive

Notre hypothèse est qu'un animal va adapter sa respiration en fonction des odeurs. Nous considérons que cette hypothèse est vraie si l'animal porte attention aux odeurs, présente un comportement de flairage actif et si la tâche est difficile. Nous ne pensons pas qu'un animal adapte se respiration s'il n'en a pas besoin, c'est-à-dire si la tâche est facile. Nous avons besoin d'une tâche active, difficile et où les odeurs sont toutes associées à une récompense. Effectivement, dans un test de récompense asymétrique, comme le Go/no Go où une seule odeur est associée à une récompense, les temps de réponse pour les stimuli récompensés et les stimuli non récompensés sont biaisés par l'anticipation de la récompense (Mainen, 2006; Quirk *et al.*, 2009). Et, on a vu dans l'introduction qu'il pouvait y avoir des variations de flairage en fonction de la tâche ainsi qu'en anticipation à une récompense. Afin que le flairage ne soit pas biaisé par cet effet anticipatoire, il nous fallait récompenser les odeurs de la même façon. Dans la mesure où le test comportemental symétrique d'Uchida et Mainen (2003), répond à toutes ces exigences, nous avons choisi de le développer dans notre pléthysmographe.

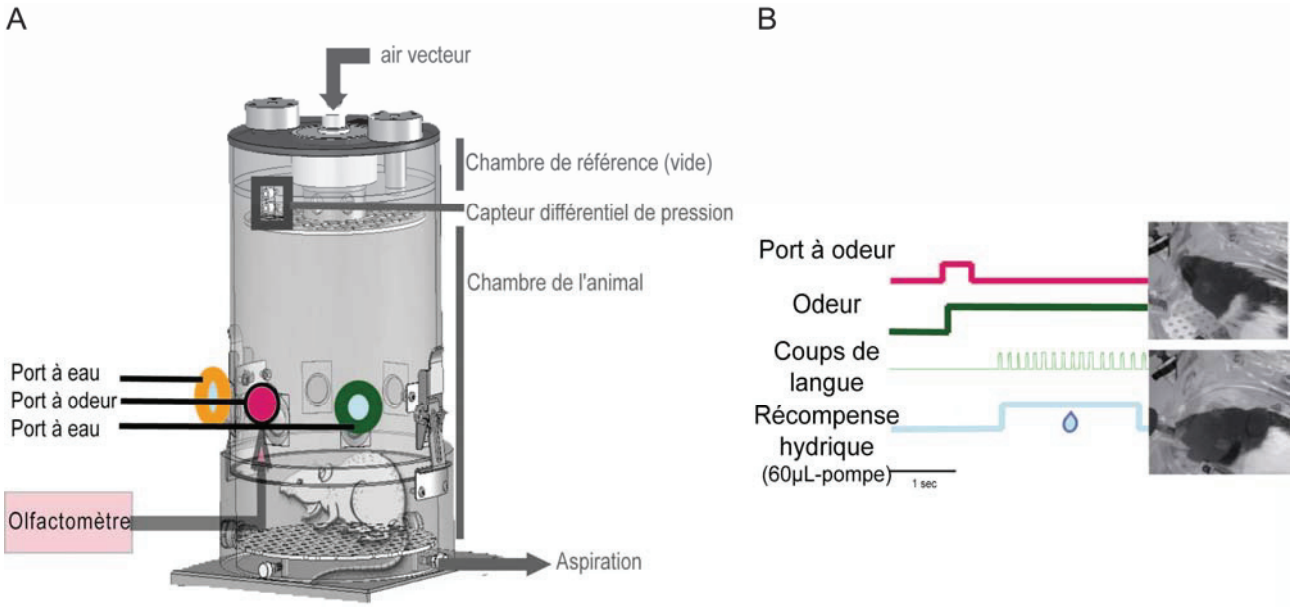


Figure 28 Dispositif expérimental. A) Schéma de la cage de pléthysmographie utilisée pour l'étude 3. Cette cage a un diamètre à sa base de 20 cm et une hauteur de 30cm. Le rat est placé dans la chambre basse, et l'on mesure une différence de pression avec la chambre de référence. Ceci nous permet d'avoir accès au signal respiratoire de l'animal de façon non invasive. Le pléthysmographe est aussi équipé de 3 ports : le central (rose) est le port relié à l'olfactomètre où le rat doit venir échantillonner l'odeur. Les ports latéraux (vert et jaune) sont disposés à équidistance du port central et sont reliés à des pompes à eau. B) Exemple d'un essai. Le rat met son nez dans le port central (rose), grâce au capteur capacitif, l'olfactomètre déclenche l'odeur (en vert foncé). Le rat fait alors son choix (correct dans cet exemple) en allant donner des coups de langue du côté gauche. Le capteur capacitif détecte les coups de langues (traits verts clairs) et le système déclenche alors la pompe à eau (en bleu).

2.3.3 Tâche de discrimination alternative à deux choix

Nous avons utilisé une tâche de discrimination alternative à deux choix inspirée de l'étude réalisée par Uchida et Mainen (2003). L'originalité de la tâche, dans notre cas, est que nous l'avons adaptée à un pléthysmographe. Le principe de base est le suivant, et nécessite 3 ports. Deux odeurs sont présentées de façon randomisée dans le port à odeur central. Chaque odeur est associée à un port latéral comprenant une pipette connectée à une pompe à eau pour délivrer la récompense hydrique (odeur 1/port à droite, odeur 2/port à gauche), l'animal doit donc discriminer les odeurs présentées et associer une odeur avec un port latéral. Avec l'équipe recherche et développement, nous avons mis au point un système permettant d'automatiser la tâche et de recueillir différents événements comportementaux. Ce système comprend un ordinateur avec un logiciel contrôlant et recueillant les données de l'olfactomètre, des capteurs capacitifs (cap'sense), des pompes à eau et un autre logiciel (Neurolasbscope) permettant l'enregistrement de l'ensemble des données comportementales et respiratoire (Fig. 28A, B).

Les rats commencent un essai en mettant leur nez dans le port central. Nous détectons la présence du nez du rat dans le port à l'aide du capteur capacitif. Ainsi nous avons accès à la durée d'échantillonnage de l'odeur de l'animal. Le signal du capteur capacitif du port à odeur

permet le déclenchement de l'olfactomètre et l'envoi d'une odeur pendant 3 secondes. La réponse comportementale du rat va être déterminée par le choix du port latéral à eau. Nous mesurons sa réponse à l'aide de capteurs capacitifs placés sur les pipettes à eau dans les ports latéraux. Ainsi, nous pouvons détecter les coups de langue donnés par l'animal. Ces signaux sont également envoyés à l'ordinateur. Si l'animal a fait le bon choix de côté, alors l'ordinateur envoie une commande à la pompe à eau afin qu'elle délivre de l'eau : 60µL par essai, sinon l'animal n'a pas de récompense. Un essai (réussi) avec l'ensemble des données enregistrées est illustré sur la figure 28B.

En parallèle à l'aide de Neurolabscope, toutes ces données sont enregistrées. Elles seront ensuite stockées sur une base SQL et analysées avec OpenElectrophy.

3 RESULTATS

3.1 Validations du protocole de double canulation

Nous avons dû tout d'abord vérifier que notre protocole de double canulation chez le rat anesthésié nous permettait de retrouver des signaux bulbaires semblables à ceux enregistrés chez un animal anesthésié respirant librement. D'autre part, en découplant l'air nasal de la respiration de l'animal, Sobel et Tank (1993) avaient montré que les décharges des cellules M/P suivaient non pas la respiration de l'animal mais l'air imposé dans la cavité nasale. Nous avons voulu vérifier s'il en était de même pour la modulation respiratoire du PCL et pour les oscillations gamma dont l'occurrence chez l'animal anesthésié respirant librement est stéréotypée par rapport au cycle respiratoire. Ces résultats sont des vérifications de notre protocole, et ne font pas l'objet d'une publication.

3.1.1 Validation du flux d'air nasal : reproduire chez le modèle canulé des réponses similaires à celles enregistrées chez l'animal respirant librement

Lorsque l'on enregistre la réponse du BO à l'acétate d'isoamyle (odeur de référence, avec des électrodes NeuroNexus Technologies) chez l'animal anesthésié à l'uréthane et respirant librement, on observe une augmentation de l'amplitude de la modulation lente liée au rythme respiratoire, l'apparition des oscillations gamma à chaque transition entre l'inspiration et l'expiration et du beta à la fin de l'expiration (Buonviso *et al.*, 2003 ; Cenier *et al.*, 2008 ; 2009). Avant de commencer nos différents protocoles, il nous fallait être sûr de reproduire des conditions similaires à celles d'un animal respirant librement. Nous avons donc testé plusieurs débits d'air grâce à notre simulateur de cycles respiratoires (voir partie 2.1), tout en imposant la même fréquence que celle de la respiration enregistrée à la sortie de la trachée de l'animal. En moyenne, chez l'ensemble de nos animaux, nous avons pu observer des signaux bulbaires similaires à l'animal anesthésié respirant librement lorsque nous utilisions un débit d'air de 500ml/min. Le débit d'air de 500ml/min est donc notre valeur basale (Fig. 29). Cette valeur est dans la gamme enregistrée par Youngentob *et al.* (1987) chez l'animal vigile.

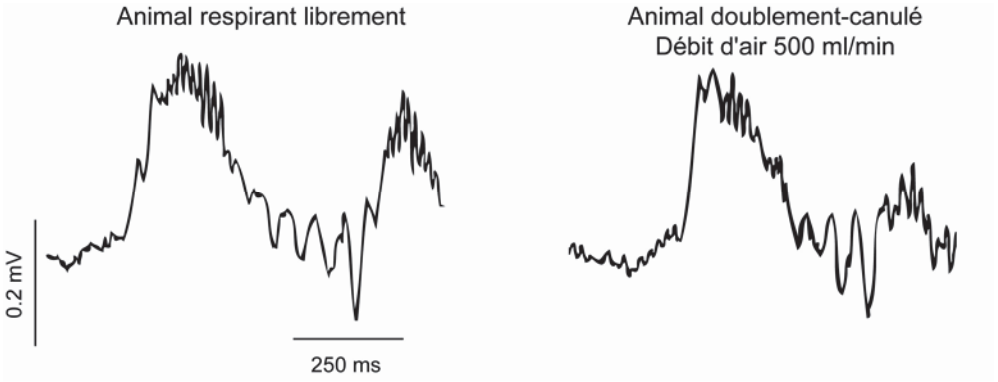


Figure 29 L'utilisation d'un débit d'air de 500ml/min permet de reproduire les réponses du PCL enregistrées chez un animal respirant librement. A gauche, enregistrement tiré de Buonviso *et al.*, 2003. Enregistrement du PCL chez un animal anesthésié respirant librement. A droite, enregistrement du PCL chez un animal doublement canulé où la respiration simulée dans la cavité nasale est à la fréquence respiratoire de la respiration de l'animal et le débit imposé fixé à 500ml/min. Dans les deux cas, la réponse à l'acétate d'isoamyl est semblable, avec une modulation lente liée au rythme respiratoire et l'occurrence des oscillations rapides beta et gamma.

3.1.2 Validation : découpler et désynchroniser la respiration imposée de la respiration de l'animal

Nous avons voulu vérifier que les activités bulbaires suivaient bien l'air nasal et pas la respiration de l'animal, comme l'avaient montré Sobel et Tank (1993). Comme ces auteurs, nous avons choisi de déphaser le flux d'air circulant dans la cavité nasale de la respiration de l'animal. Grâce à notre simulateur de cycles respiratoires (voir partie 2.1), nous pouvons imposer dans la cavité nasale une respiration similaire à celle de l'animal et déphaser cette respiration imposée de la respiration de l'animal. Nous avons imposé quatre conditions de déphasage : en phase (la respiration imposée est en phase avec celle de l'animal) ou déphasée de ¼, ½ et ¾ de cycle par rapport à la respiration de l'animal. Ce protocole est résumé dans la figure 30A.

Nous nous sommes intéressées à la modulation respiratoire et, parce qu'elles sont facilement identifiables et détectables, aux oscillations gamma (35-90Hz).

Dans un premier temps, nous avons vérifié que quelle que soit la condition de phasage, la modulation respiratoire et les oscillations gamma persistaient. En prenant comme repère temporel le pic de la modulation respiratoire dans le PCL, nous avons observé que celui-ci reste toujours phasé avec la respiration imposé alors qu'il ne suit pas la respiration de l'animal (non montré).

Nous avons ensuite observé que les oscillations gamma, quel que soit le déphasage entre les deux respirations, apparaissaient toujours à la même phase de la respiration nasale imposée (Fig. 30B à gauche). En revanche, si l'on regarde (Fig. 30B à droite) les oscillations gamma par rapport à la respiration de l'animal, on voit qu'au fur et à mesure que le flux d'air nasal est décalé de la respiration de l'animal, les oscillations gamma se décalent.

Finalement, nous avons observé que les activités du PCL bulbaires suivaient non pas la respiration de l'animal mais la respiration imposée dans la cavité nasale. Ce résultat est tout à fait en concordance avec les données de Sobel et Tank (1993).

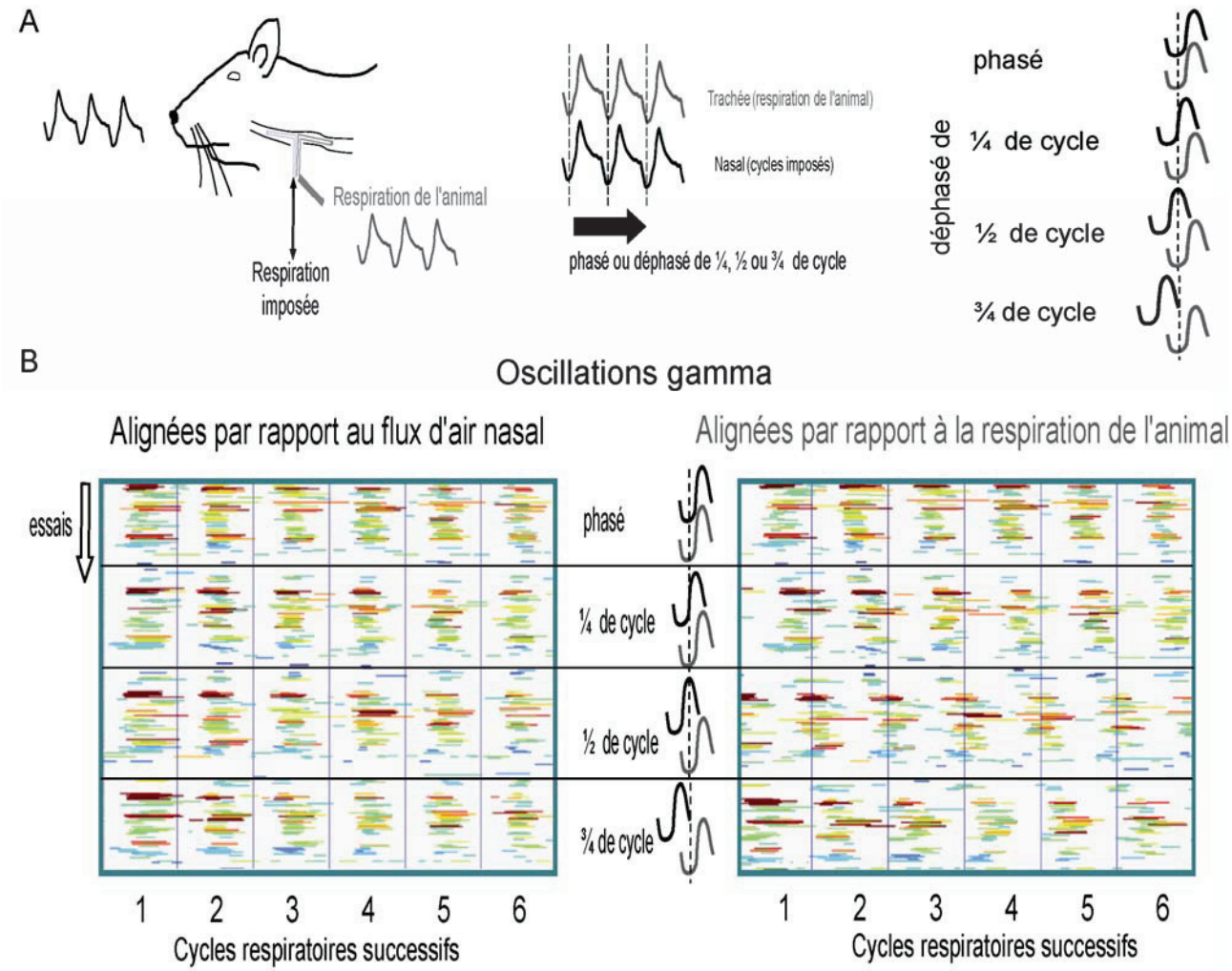


Figure 30 Les activités bulbaires suivent la respiration nasale. A) Protocole de déphasage. De gauche à droite, rappel du protocole de double-canulation chez le rat anesthésié à l'uréthane, en gris, la respiration de l'animal enregistrée à la sortie de la canule trachéale et en noir, la respiration imposée dans la cavité nasale. Le protocole consiste à déphaser le cycle respiratoire imposé dans la cavité nasale de celui de l'animal. Tout à droite, les 4 conditions de phasage. Tout en haut les cycles respiratoires imposés et de l'animal sont phasés puis en allant vers le bas, nous avons appliqué un décalage entre les cycles respiratoires de l'animal et les cycles imposés. B) Les oscillations gamma détectées sont représentées par les traits. La longueur des traits représente la durée de la bouffée de l'oscillation gamma. La couleur représente la puissance du gamma dans une unité arbitraire, plus la couleur est chaude, plus l'oscillation détectée est puissante. Chaque ligne représente un essai. Les oscillations gamma sont représentées et alignées soit par rapport au flux d'air nasal (à gauche) soit par rapport à la respiration de l'animal (à droite). A gauche, quelque soit le déphasage, les oscillations gamma sont toujours positionnées au même endroit du cycle respiratoire nasal imposé (abscisse cycles respiratoires successifs). En revanche, lorsqu'elles sont alignées par rapport à la respiration de l'animal (à droite), on voit clairement que les oscillations gamma se décalent au fur et à mesure de l'augmentation du déphasage entre la respiration de l'animal et la respiration imposée dans la cavité nasale.

Au cours de ma thèse, nous avons posé deux principales questions : 1) Quels sont les effets des variations de paramètres respiratoires sur l'activité bulbaire ? et 2) quelle est l'utilité des variations de flairage pour l'animal qui se comporte? Nous avons répondu à la première question en réalisant deux études : les études 1 et 2. Dans l'étude 1, nous étudions à la fois l'effet de l'air seul et l'effet des variations de débit sur la réponse bulbaire aux odeurs. Et dans l'étude 2, nous avons étudié les effets conjoints des variations de fréquence et de débit sur la réponse bulbaire aux odeurs. Par conséquent, le chapitre 3.2 correspond à la première partie de l'étude 1 (effets de l'air sans odeur sur l'activité bulbaire). Le chapitre 3.3 comprend la deuxième partie de l'étude 1 et l'étude 2. J'ai choisi ce découpage pour regrouper thématiquement les questions. Enfin le chapitre 3.4 est consacré à la deuxième grande question de ma thèse et comporte l'étude 3.

3.2 Importance de la mécanosensibilité de l'EO pour l'activité spontanée du BO (étude 1)

3.2.1 Contexte et résumé

Une rythmicité respiratoire persiste à tous les niveaux du système olfactif en l'absence d'odeur. Différents auteurs ont posé l'hypothèse (Adrian, 1951 ; Ueki et Domino, 1961 ; Onoda et Mori, 1980) que cette rythmicité persistait grâce à l'existence d'une mécanosensibilité du système olfactif. Ce n'est que récemment que Grosmaitre *et al.* (2007) ont montré que les neurorécepteurs olfactifs étaient à la fois capables de répondre à des stimuli odorants mais également à des pressions. Au niveau du premier relais cérébral de l'information odorante, certains auteurs ont noté, que lorsque l'air ne circule pas dans la cavité nasale, la modulation respiratoire du potentiel de champ local (PCL, Gray et Skinner, 1988b) et l'activité rythmée des cellules M/P (Onoda et Mori, 1980) disparaissaient. Mais aucun de ces auteurs n'a produit une quantification précise de l'importance de la présence du flux d'air nasal sur 1) la présence de la modulation respiratoire spontanée (en l'absence d'odeur) du PCL et 2) l'activité de décharge de cellules M/P. Pour donner une description précise de l'effet de l'air seul sur l'activité bulbaire, nous devions être capables de découpler le flux d'air passant dans la cavité nasale de la respiration de l'animal. Nous avons utilisé un protocole de double-canulation chez le rat anesthésié nous permettant de contrôler précisément les flux d'air dans la cavité nasale. Ainsi nous avons soit pu reproduire un flux d'air dans la cavité nasale équivalent à celui de la respiration de l'animal soit abolir le flux d'air dans la cavité nasale. En parallèle, l'activité spontanée du BO a été enregistrée. Nous avions accès à la fois à l'activité du PCL mais également à l'activité unitaire des cellules M/P.

Premièrement, en présence d'air et de façon spontanée, nous avons observé une modulation respiratoire du PCL. Lorsque l'air ne circule pas dans la cavité nasale, cette modulation respiratoire du PCL disparait complètement. Lorsque l'air re-circule dans la cavité nasale, la rythmicité respiratoire réapparaît. En imposant dans la cavité nasale un flux d'air continu, nous avons observé que la modulation respiratoire disparaissait au niveau du PCL. La modulation respiratoire du PCL est donc liée à l'entrée rythmique d'air au sein de la cavité nasale.
Deuxièmement, nous nous sommes penchées sur l'étude de la décharge des cellules M/P en réponse à de l'air pur. Nous avons pu observer deux populations de cellules M/P. La première que nous avons qualifiée de cellules « insensibles à l'air[3] ». L'activité de ces cellules est caractérisée par une absence de changement d'activité de décharge (de fréquence de décharge ou de patterns respiratoires) que l'air circule ou pas dans la cavité nasale. A l'inverse, nous avons observé une population de cellules M/P dites « sensibles à l'air ». Ces cellules sont caractérisées par un changement d'activité en réponse à l'imposition d'air dans la cavité nasale Ces cellules sensibles à l'air représentent 27% de la population de cellules M/P enregistrées. Mais de façon très importante, nous avons pu montrer que cette sensibilité à l'air conférait aux cellules M/P des patterns de décharge particuliers. Effectivement la majorité des cellules sensibles à l'air, en présence d'air, présente un pattern de décharge synchronisé à la respiration.
Nous montrons donc que la circulation périodique de l'air dans la cavité nasale permet la genèse au niveau du PCL de la modulation respiratoire et permet à certaines cellules de décharger de façon rythmée à la respiration. Cette « mise sous tension » du système olfactif par la mécanosensibilité pourrait le préparer à recevoir l'information odorante, c'est-à-dire maintenir une excitation synaptique dans le réseau bulbaire capable de traiter les inputs sensoriels périodiques.

3.2.2 Résultats (étude 1).

Les résultats de cette étude sont parus sous forme publiée et sont combinés dans un même article avec les résultats des effets du débit respiratoire :
Reshaping of bulbar odor response by nasal flow rate in the rat.
Courtiol E, Amat C, Thévenet M, Messaoudi B, Garcia S, Buonviso N.
PLoS One. 6(1):e16445 (2011a)

[3] *Ce sont les neurorécepteurs qui sont sensibles à l'air et qui activent ensuite les cellules M/P, mais par souci de simplification nous avons parlé de sensibilité des cellules M/P à l'air.*

3.3 Effets des variations de paramètres respiratoires sur l'activité bulbaire (études 1 et 2)

3.3.1 Effet du débit respiratoire

3.3.1.1 Contexte et résumé

Respiration et olfaction entretiennent un inextricable lien. L'activité du système olfactif est profondément marquée par la respiration. Or la respiration ou flairage est un acte très dynamique, notamment en terme de fréquence et de débit respiratoire (Youngentob *et al.*, 1987). Parce que la respiration est le vecteur des molécules odorantes, les variations de ses paramètres ont un impact sur la déposition des molécules odorantes et donc sur l'activation de l'EO. Plusieurs études se sont intéressées à l'impact des variations de fréquence respiratoire sur l'activité de l'EO au niveau des terminaisons des neurorécepteurs (Verhagen *et al.*, 2007 ; Wesson *et al.*, 2008a ; 2009 ; Carey *et al.*, 2009). En revanche, seulement quelques études pointent un effet majeur du débit respiratoire. Effectivement, il a été montré *in vitro* que les zones d'activations de l'EO étaient différentes selon le débit inspiratoire imposé (Kent *et al.*, 1996 ; Scott-Johnson *et al.*, 2000). De plus, Oka *et al.* (2009) ont montré que le seuil et l'amplitude de la réponse des terminaisons des neurorécepteurs dans les glomérules étaient profondément modulés par le débit respiratoire. Aucune donnée, à ce jour, n'a caractérisé l'effet du débit respiratoire sur 1) l'activité de réseau du BO (PCL) et 2) le message de sortie du BO (décharge des cellules M/P). Nous avons donc souhaité savoir si, et comment des variations de débit respiratoire pouvaient affecter l'activité du BO en réponse aux odeurs. En utilisant un protocole de double-canulation chez le rat anesthésié, nous avons précisément contrôlé et imposé des cycles respiratoires dans la cavité nasale avec 3 débits différents. En parallèle, l'activité oscillatoire du BO et l'activité extra-cellulaire unitaire des cellules M/P ont été enregistrées sous les 3 conditions de débit respiratoire.

Premièrement, nous avons pu mettre en évidence que l'occurrence des oscillations rapides était dépendante du débit respiratoire. Un fort débit respiratoire favorise l'expression des oscillations gamma, à l'inverse, un faible débit respiratoire favorise l'occurrence des oscillations beta. Deuxièmement, au niveau de la réponse aux odeurs des cellules M/P, nous avons démontré que 1) le pourcentage de cellules M/P répondant aux odeurs était fonction du débit respiratoire et 2) les patterns de décharge des cellules M/P en réponse aux odeurs étaient modifiés par le débit respiratoire. Enfin, nous avons démontré que le phasage des potentiels d'action des

cellules M/P sur les oscillations rapides était affecté par des variations de débit respiratoire. Un débit basal ou fort favorise le phasage des potentiels d'action des cellules M/P sur l'oscillation gamma, au contraire un faible débit favorise le phasage avec l'oscillation beta. Pris dans leur ensemble, nos résultats montrent que les variations de débit respiratoire affectent profondément la réponse du BO aux odeurs. Il est donc nécessaire de considérer non seulement les effets de la fréquence mais également du débit respiratoire sur l'activité du système olfactif.

3.3.1.2 Résultats (étude 1)

Les résultats de cette étude sont parus sous forme publiée :
Reshaping of bulbar odor response by nasal flow rate in the rat.
Courtiol E, Amat C, Thévenet M, Messaoudi B, Garcia S, Buonviso N.
PLoS One. 6(1):e16445 (2011a)

Ces résultats ont également été utilisés dans une étude de modélisation où l'on s'intéressait à la relation entre l'intensité de l'input et la stabilité des oscillations. Cette étude est parue sous forme publiée et l'article figure dans la partie annexes de ce manuscrit (page 182).
Stability of fast oscillations in the mammalian olfactory bulb: experiments and modeling. Fourcaud-Trocmé N, **Courtiol E**, Buonviso N, Voegtlin T.J Physiol Paris. 105:59-70 (2011).

OPEN ACCESS Freely available online

PLoS one

Reshaping of Bulbar Odor Response by Nasal Flow Rate in the Rat

Emmanuelle Courtiol*, Corine Amat, Marc Thévenet, Belkacem Messaoudi, Samuel Garcia, Nathalie Buonviso

Université Lyon 1, Centre National de la Recherche Scientifique, UMR 5020 Neurosciences Sensorielles, Comportement, Cognition, Lyon, France

Abstract

Background: The impact of respiratory dynamics on odor response has been poorly studied at the olfactory bulb level. However, it has been shown that sniffing in the behaving rodent is highly dynamic and varies both in frequency and flow rate. Bulbar odor response could vary with these sniffing parameter variations. Consequently, it is necessary to understand how nasal airflow can modify and shape odor response at the olfactory bulb level.

Methodology and Principal Findings: To assess this question, we used a double cannulation and simulated nasal airflow protocol on anesthetized rats to uncouple nasal airflow from animal respiration. Both mitral/tufted cell extracellular unit activity and local field potentials (LFPs) were recorded. We found that airflow changes in the normal range were sufficient to substantially reorganize the response of the olfactory bulb. In particular, cellular odor-evoked activities, LFP oscillations and spike phase-locking to LFPs were strongly modified by nasal flow rate.

Conclusion: Our results indicate the importance of reconsidering the notion of odor coding as odor response at the bulbar level is ceaselessly modified by respiratory dynamics.

Citation: Courtiol E, Amat C, Thévenet M, Messaoudi B, Garcia S, et al. (2011) Reshaping of Bulbar Odor Response by Nasal Flow Rate in the Rat. PLoS ONE 6(1): e16445. doi:10.1371/journal.pone.0016445

Editor: Steven Barnes, Dalhousie University, Canada

Received October 26, 2010; **Accepted** December 19, 2010; **Published** January 26, 2011

Copyright: © 2011 Courtiol et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This work was supported by a grant from "Agence Nationale de la Recherche" (#ANR-07-NEURO-030). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: ecourtiol@olfac.univ-lyon1.fr

Introduction

Nasal airflow is the natural vector for odorant molecules so that respiration and odorant sampling are indissociable. Nasal airflow is thus a major parameter to take into consideration when studying olfactory processing in mammals, especially because sniffing parameters, such as frequency and flow rate (ml/min), are highly variable [1–3]. The importance of nasal airflow dynamics has been revealed at the olfactory epithelium (OE) level. First, olfactory receptor neurons (ORNs) have been shown to be sensitive to air pressure [4]. Second, low versus high flow rates differentially favor sorption of odorant molecules depending on their solubility [5–7], resulting in differential influence on activity patterns across the OE [8,9].

Due to the anatomical organization of the epithelio-bulbar projections [10–12], a change in OE activity should be reflected in olfactory bulb (OB) activity. Indeed, optical recordings reveal that glomerular activation varies with sniffing frequency [13–15]or flow rate [16], and a sniff frequency-dependent attenuation of glomerular inputs has also been described [15]. At the level of individual mitral/tufted cell (M/T) activity, in the anesthetized rat, temporal patterns of M/T cells reflect the phasic stimulation of ORNs at each inspiration [17]. In the behaving rodent, natural changes in sniffing frequency lead to changes in the variability and spatial organization of M/T cell responses [18]. Importantly, temporal patterning of M/T cells is frequently lost during high frequency sniffing [18–20]. All of these studies have focused on the effects of sniffing frequency variation on bulbar activity. Conversely, the effects of nasal flow rate variation on M/T cell and local field potential (LFP) responses have not been studied, to our knowledge. It thus appeared essential to characterize nasal airflow-induced changes in OB response. If sampling behavior can change the characteristics of information carrier (spikes and LFP), then it would be necessary to reconsider the notion of odor coding. To investigate these modifications, we used a double cannulation and simulated nasal airflow protocol in anesthetized rats to uncouple nasal airflow from animal respiration. Both unit M/T cell extracellular activity and LFP were recorded during different conditions of nasal flow rate. We found that airflow changes in the normal range were sufficient to substantially reorganize the response of OB and determined that nasal airflow itself modifies spontaneous OB activity.

Results

Under basal flow rate conditions and for the majority of animals, we observed a temporal pattern of LFP signals in response to ISO similar to those of non-tracheotomized rats (Fig. 1A1 and A2, middle). The few animals in which we did not observe the alternation between beta and gamma oscillations under ISO stimulation at the basal flow rate were not retained for the analysis. Analyses were performed on 12 rats.

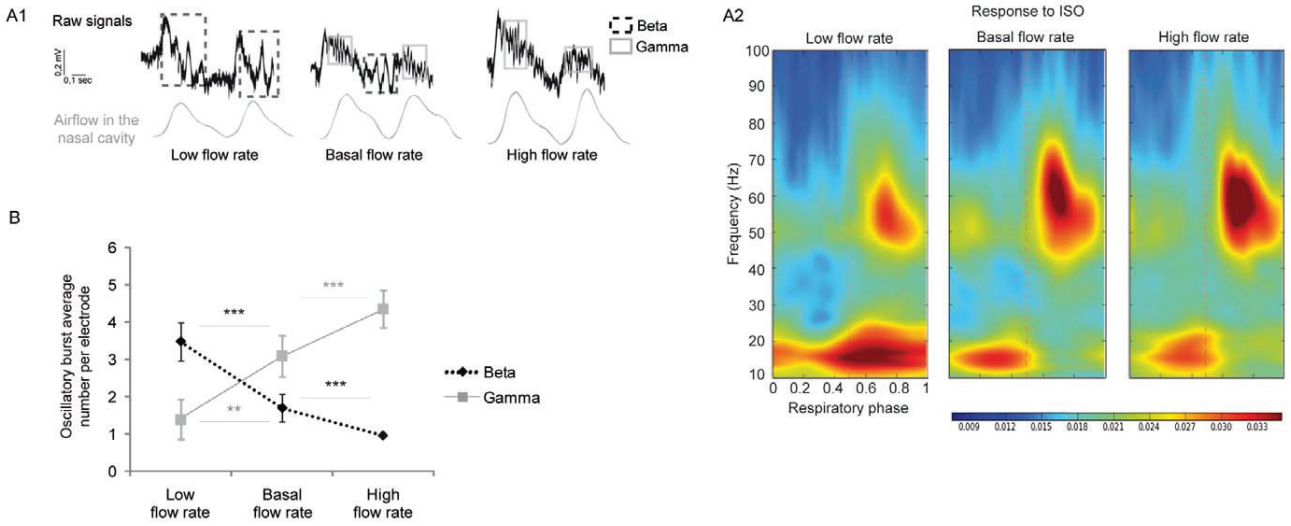


Figure 1. Modification of LFP oscillatory patterns. A1) Raw data collected from the same electrode in response to ISO under low (left), basal (middle) and high (right) flow rate conditions. A2) Representation of an average respiratory phase-frequency of LFP oscillatory activity under low, basal and high flow rate conditions in response to ISO. Amplitude is color-coded (the calibration scale below is common to the three representations in arbitrary units). Oscillation frequencies are represented relative to their position in the respiratory cycle, indicated in phase from 0 (beginning of inspiration) to 1 (end of expiration). Phase 0.5 indicates the transition between inspiration and expiration epochs. An average was calculated from signals recorded by all electrodes from 12 trials in each condition. B) Mean (± SEM) number of oscillatory bursts per electrode under low, basal and high flow rate conditions. For each trial, the same electrode was selected for the three flow rate conditions (n = 23 trials). Statistical test: Wilcoxon, *p<0.05, **p<0.01 and ***p<0.001.
doi:10.1371/journal.pone.0016445.g001

Effect of nasal airflow on bulbar odor responses

Analyses were performed on 69 paired trials (23 trials for each flow rate condition) containing a total of 36 cells. To evaluate if nasal airflow shaped odor response at the olfactory bulb level, we first explored its influence on odor-induced LFP oscillations and then on M/T cell responses to odors. Next, we explored the influence of nasal airflow on the phase locking between M/T cell unit activity and LFP oscillations. For most analyses, since odors induced no statistical difference in the global proportion of respiratory-pattern activities, responses to odors were pooled.

LFP activity. Examples of typical signals in response to ISO are presented in Figures 1A1 and A2. In this example, while the classical alternation between gamma and beta oscillations on the respiratory cycle was observed at the basal flow rate (Fig. 1A1, A2, middle), low and high flow rate conditions induced LFP modifications. On the raw signal, the low flow rate (left) induced more numerous beta oscillatory bursts at the expense of gamma oscillatory bursts. In the example of Figure 1A2, the beta oscillatory burst appeared longer under low flow rate than under basal flow rate conditions. For analysis of the whole data set, we compared data from recordings obtained under low, basal and high flow rate conditions, performed at the same site from the same electrode under the three conditions. We first compared the number of beta or gamma oscillatory bursts per electrode and per recording under each flow rate condition (Fig. 1B). We observed that the mean number of gamma oscillatory bursts significantly increased with increasing flow rate (low versus basal: Wilcoxon = 27.5, $p<0.01$; basal versus high: Wilcoxon = 15, $p<0.001$). Conversely, the mean number of beta oscillatory bursts significantly decreased (low versus basal, Wilcoxon = 7, $p<0.001$; basal versus high, Wilcoxon = 17.5, $p<0.001$), indicating that nasal airflow can quantitatively change the LFP pattern. We next examined if the intrinsic characteristics of oscillations, such as duration, amplitude and frequency, could also be modified by flow rate. The only significant modifications we observed concerned gamma oscillations; the duration of gamma episodes was significantly decreased when flow rate was decreased relative to basal flow rate (Table 1, Wilcoxon = 3, $p<0.05$), and their amplitude was significantly decreased (Table 1, Wilcoxon = 3, $p<0.05$).

In summary, the occurrence probability for odor-evoked LFP oscillations was strongly modified by nasal flow rate, while the intrinsic characteristics of oscillations were less or not. The next

Table 1. Means (± SEM) of LFP intrinsic characteristics.

		Beta	Gamma
Characteristics	**Flow rate**	**Average** *(±SEM)*	**Average** *(±SEM)*
Duration (s)	Low	0.242 *(±0.016)*	0.101 *(±0.008)*
	Basal	0.209 *(±0.014)*	0.135 *(±0.011)*
	High	0.215 *(±0.163)*	0.132 *(±0.011)*
Amplitude (Arbitrary unit)	Low	9.137 *(±0.804)*	9.544 *(±0.677)*
	Basal	9.446 *(±0.846)*	12.479 *(±1.802)*
	High	8.548 *(±1.113)*	9.871 *(±1.134)*
Frequency (Hz)	Low	15.900 *(±0.462)*	52.821 *(±1.035)*
	Basal	16.949 *(±0.576)*	53.749 *(±1.273)*
	High	14.912 *(±0.560)*	54.656 *(±1.108)*

Duration (second), amplitude (arbitrary units) and frequency (hertz) are presented for beta and gamma oscillations and for the three flow rate conditions. Data from low and high flow rate conditions were compared to data from the basal flow rate condition (n = 23 trials). Statistical test: Wilcoxon, *p<0.05.
doi:10.1371/journal.pone.0016445.t001

step was to ask whether the M/T cell unit activity in response to odors was modified by nasal flow rate.

M/T cell activities. We recorded 36 mitral cells under each flow rate condition. We first compared M/T cell responsiveness under the three flow rate conditions. A cell was considered responsive when its respiratory pattern and/or frequency changed from a spontaneous to an odor period. A decreasing flow rate resulted in a significant decrease in the percentage of responsive M/T cells (low: 66.7% vs. basal: 88.9%; Chi^2 (1) = 5.142, $p<0.05$). No significant difference was observed between basal and high flow rate conditions (88.9% vs. 91.7%, respectively; Chi^2 (1) = 0.158, $p>0.05$). When comparing the mean instantaneous firing frequency under the three flow rate conditions (Fig. 2A1), we observed that it reached approximately 50–60 Hz under the basal (61.58 Hz) and high (51.26 Hz) flow rate conditions, as reported in non-tracheotomized animal [21,22]. Interestingly, it was significantly decreased under the low flow rate condition (low: 42.89 Hz vs. basal: 61.58 Hz). For a detailed view, see Figure S1 showing the matrix of the mean instantaneous frequency for each cell under each flow rate condition. We next compared the mean instantaneous frequency of M/T cells as a function of the respiratory cycle under each flow rate condition. Respiration-triggered histograms showed that M/T cell activity remained modulated by the respiratory rhythm, regardless of the flow rate (Fig. 2A2). Distribution of M/T cell mean instantaneous frequency relative to the respiratory cycle was compared using the Equal Kappa Test. This test revealed a significant difference of distribution between low and basal conditions ($p<0.001$) while there was no statistical difference between basal and high flow rate conditions.

We then compared the proportion of respiration-related patterns under the three flow rate conditions. Figure 2B1 shows the respiration-related patterns of a series of 36 M/T units recorded under the three flow rate conditions. Even though no significant difference appeared in the total proportion of each pattern between the three conditions (Fig. 2B2), 58.3 and 50% of the patterns were modified when airflow was decreased and increased, respectively, relative to the basal flow rate (Fig. 2B1). Thus M/T cell respiratory-pattern in response to the same odor is modified depending on imposed nasal flow rate.

We observed that nasal airflow influenced both OB unit and network activities. Finally, we investigated the temporal relationship between spikes and LFP oscillations.

Relation between LFP and unit activity. To characterize the temporal relationships between oscillatory fields and individual spikes, we plotted the spike phase distribution for each cell for both beta and gamma bands under each flow rate condition. Phase histograms were then computed across cells. The significance of spikes/LFP phase locking was tested on the histograms (Rayleigh test; Fig. 3). Our analysis revealed a significant phase locking between spikes and beta oscillations only for the low flow rate condition. Conversely, a significant phase locking was observed between spikes and gamma oscillations for all three flow rate conditions (Rayleigh test, $p<0.05$). We then compared the strength of phase locking between the three flow rate conditions using the Equal Kappa test. This test revealed a significant difference of phase locking strength between basal and high flow rate conditions for the gamma oscillation (Fig. 3B). Hence, the higher the flow rate was, the stronger the spike phase locking to gamma phase was. Conversely, the lower the flow rate was, the stronger the spike phase locking to the beta phase was (Fig. 3A).

We showed here that changing flow rate modified odor response at the level of the OB. Since, in our experimental conditions, changing airflow modified both air pressure in the nasal cavity and the odorant stimulation (i.e., the quantity and migration of odor molecules), we then wanted to determine the relative influence of nasal airflow itself and that of the odor. Since odorant stimulation cannot be applied without nasal airflow, we attempted to answer this question by examining the effect of nasal airflow on OB spontaneous activity.

Effect of deodorized nasal airflow on bulbar activity

First, we tested the effect of the presence of a respiration-modulated deodorized airflow (nasal airflow ON, 500 ml/min at the basal flow rate) versus its absence (nasal airflow OFF) in the nasal cavity on OB spontaneous activity (96 trials for each condition, with 45 cells detected). Effect of continuous deodorized nasal airflow on LFP activity was also tested on three additional rats. Second, we tested the effect of different nasal flow rates of deodorized air on M/T cell spontaneous activity (23 trials under low, basal and high flow rate conditions, with 36 cells detected).

LFP activity. Since there was no airflow through the nasal cavity in the OFF condition, we used animal respiration as the time base for signal analyses (Fig. 4A). Even though fast LFP oscillations did not appear without odor, the slow rhythm related to respiration (1–3 Hz) was present. As shown in Figures 4A1 and A2 (bottom), when deodorized airflow passed through the nasal cavity, we observed a slow rhythm. Conversely, under the nasal airflow OFF condition, we never observed the slow rhythm (Fig. 4A1, A2, top). We then tested the influence of flow rate modulation on spontaneous slow LFP activity. Surprisingly, no significant difference appeared in the slow LFP modulation amplitude when flow rate was decreased (200 ml/min) or increased (800 ml/min, data not shown). In addition, even by increasing or decreasing nasal flow rate, fast LFP oscillations did not appear. To complete the study of the effect of nasal airflow on slow LFP modulation activity, we tested the effect of a continuous nasal airflow at 200, 500 and 800 ml/min. On the 27 trials realized in three rats, we never observed a slow rhythm induced by a continuous nasal airflow whatever the flow rate condition (Figure S2).

M/T cell activity. Forty-five mitral cells were recorded both in nasal airflow ON and OFF conditions (deodorized air). When airflow was switched from OFF to ON (500 ml/min) in the nasal cavity, two M/T cell populations were revealed. First, we found air-insensitive M/T cells, defined as cells that did not change their temporal firing pattern and/or spike frequency when airflow was ON in the nasal cavity compared to the nasal airflow OFF condition. Out of 45 cells, 33 (73%) were insensitive to airflow. A representative example is shown in Figure 4B1 (a). Conversely, 12 cells (27%) were air-sensitive M/T cells and were characterized by a significant change in their spiking activity when airflow was ON in the nasal cavity [see Fig. 4B1 (b)]. This representative cell did not present activity when nasal airflow was OFF, but it presented respiration-related activity when nasal airflow was ON. To recapitulate pattern changes in air-sensitive mitral cells, respiration-related patterns were classified into three groups (Fig. 4B2): NULL, NS and SYNCHRO (in which S+, S-and Sc patterns were pooled). As shown in Figure 4B2, when nasal airflow was OFF, 75% of cells presented a NULL activity, and 25% presented an NS activity. When nasal airflow was turned ON, the majority of air-sensitive cells adopted an activity synchronized with respiration (SYNCHRO: 58.33%), whereas NULL activity no longer existed.

Mitral cell spontaneous activity was then studied under the three flow rate conditions. A total of 36 cells were recorded under each flow rate condition (deodorized air). When comparing the mean instantaneous frequency rate between flow rate conditions (Fig. 5A1), we observed, as in response to odors, that spontaneous activity had a lower mean instantaneous frequency rate in the low flow rate condition (basal: 41.15 Hz vs. low: 24.06 Hz; $p<0.05$). No significant difference was observed between basal and high flow rate

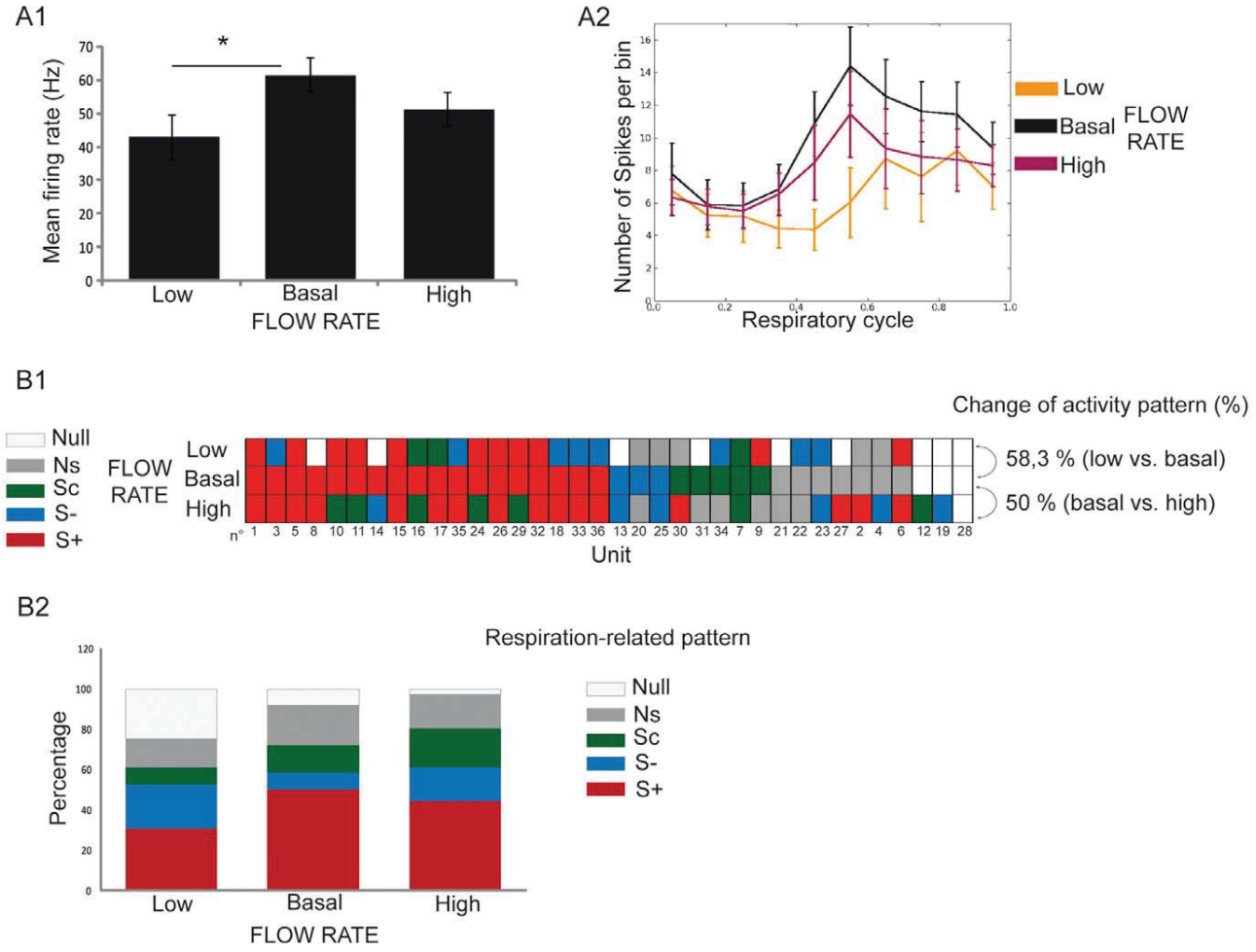


Figure 2. Nasal flow rate modifies mitral cell response to odors. Thirty six mitral cells were recorded under the three flow rate conditions. A1) Mean instantaneous frequency rate (± SEM) under each flow rate condition (n = 36). Paired t-test, *p<0.05. A2) Mean instantaneous frequency (or number of spikes per bin, ± SEM) as a function of respiratory cycle under the three flow rate conditions (low flow rate: orange, basal flow rate: black, and high flow rate: purple). B1) Matrix representing respiration-related patterns of each cell recorded under the three flow rate conditions. Each line represents a flow rate condition, and each column represents a unit. A color was attributed to each pattern: excitatory synchronized (S+, red), suppressive synchronized (S−, blue), complex synchronized (Sc, green), respiration non-related (NS, dark gray) and null activity (NULL, light gray). Cells are ordered according to their respiratory-related pattern at basal flow rate. The percent of change in activity pattern represents the percent of units exhibiting a different pattern under the two flow rate conditions. B2) Percentages of each activity pattern as a function of flow rate condition (n = 36). Low and high nasal flow rate conditions were compared to the basal flow rate. Statistical test: chi^2.
doi:10.1371/journal.pone.0016445.g002

conditions. For a detailed view, see Figure S1 showing the matrix of the mean instantaneous firing frequency for each cell under each flow rate condition. We also compared the mean instantaneous frequency as a function of respiratory cycle for each flow rate condition (Fig. 5A2). No obvious modulation of the instantaneous frequency was present, with the exception of a slight one at the high flow rate. Equal Kappa test did not reveal any significant difference of instantaneous frequency distribution relative to the respiratory cycle between the three flow rate conditions.

To explore to what extent M/T cell activity pattern modifications in response to odors were modified by nasal airflow variation, we next studied the effect of nasal flow rate modulation on the spontaneous activity patterns of M/T cells in the absence of any odor (Fig. 5B1). In a global view, proportions of the spontaneous activity respiratory patterns differed from those under odor conditions, as the NULL and NS patterns were the patterns most observed regardless of the flow rate condition. As seen in response to odors, even though no specific activity pattern appeared when flow rate was increased or when it was decreased (Fig. 5B1, B2), 50 and 55.6% of these patterns were modified when airflow was decreased and increased, respectively (Fig. 5B1).

Discussion

The aim of this study was to examine the extent that OB odor response was influenced by nasal flow rate variation. For this purpose, we used a double tracheotomy paradigm coupled with a respiratory cycle simulation in the nasal cavity. We extended and corroborated the earlier conclusion of various authors [4,23,24] showing that nasal airflow itself imposes a respiratory rhythm to OB activity. Importantly, we observed that flow rate modifications induced variations of different odor information carriers: LFP oscillatory activity, M/T single cell activity and spike phase locking to LFP oscillations.

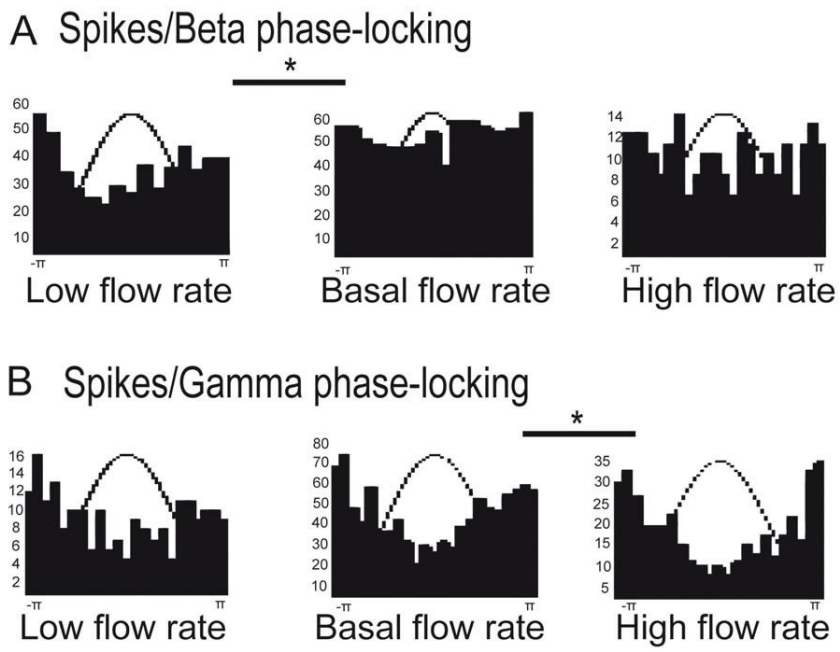


Figure 3. Spike phase locking to LFP oscillations is modified by nasal flow rate. Each histogram represents spike distributions relative to the oscillation phase for each flow rate condition. A) Phase locking between spikes and beta oscillations [number of spikes for each condition: low flow rate (n = 516), basal flow rate (n = 661) and high flow rate (n = 228)]. B) Phase locking between spikes and gamma oscillations [number of spikes for each condition: low flow rate (n = 188), basal flow rate (n = 1019) and high flow rate (n = 370)]. Statistical test: Equal Kappa test, *$p<0.05$.
doi:10.1371/journal.pone.0016445.g003

Nasal airflow tunes OB activity during the respiratory cycle

Adrian [23] first demonstrated a periodic LFP activity in the OB related to the animal's respiration. On unitary level, M/T cells fire in relation with air intake in absence of olfactory stimuli [25,26]. Similarly, olfactory receptor neuron terminals are activated by natural sniffing of deodorized air in the awake rat [24]. Recently, Grosmaitre [4] proposed an explanation about respiration-related rhythmicity by showing that ORNs are sensitive to air pressure. Consistent with these results, we showed that airflow suppression in the nasal cavity led to suppression of respiration-related slow LFP oscillation (Fig. 4A). Application of a continuous nasal airflow did not led to respiration-related slow LFP oscillation whatever the flow rate (Figure S2). At mitral cell activity level, a continuous nasal airflow did not induce a respiration related pattern in mitral cells; conversely, mitral cells adopted a continuous firing [17]. Effect of central structures as a source of respiratory modulation could not be excluded [27]. Periphery and central structures probably act in concert. However, in our conditions, nasal airflow seems to be the most prominent source of respiratory modulation.

Second, we observed a population of M/T cells that adopted a respiration-related pattern of activity when airflow was applied to the nasal cavity (Fig. 4B). These observations appear to confirm the hypothesis according to which mechanosensitivity of ORNs may be a peripheral drive to synchronize OB rhythmic activity with respiration [4]. This respiratory tuning at the level of the network and M/T cells constitutes a major process for synchronizing OB and higher order structures, such as the piriform cortex, which also presents respiration-related activity [28–30]. Bulbar respiratory tuning by nasal airflow could permit an optimal coupling between olfactory structures, which may be important for information transmission. Furthermore, this bulbar "pre-activation" by nasal airflow could prepare the OB to process odor stimuli [31]. By imposing a basal activity to the OB, nasal airflow may provide an excitatory source to the OB, which in turn could facilitate its response to odors.

Nasal flow rate strongly impacts odor response in the OB

Numerous authors have shown that OE odor responses are modified by nasal flow rate [7–9]. Such modifications have also been revealed at the glomerular level. In particular, it has been recently reported that glomerular responses are affected by nasal flow rate [16]. Considering this, our data show for the first time that the response to odors of both OB network and output (M/T cells) are modified by nasal flow rate variations (Fig. 1 and Fig. 2). We showed that modifications of nasal airflow not only influence bulbar input but also its output activity. At the network level, gamma oscillations appeared more often under the high nasal flow rate, while beta oscillations appeared more often under the low flow rate. These results can be simply interpreted in terms of bulbar activation related to the odorant stimulation level which can be induced by each flow rate. Gamma oscillation prevalence is likely due to the high bulbar activation related to a high flow rate. It has been shown that the gamma oscillation is favored by high odor concentration [32] and high vapor-pressure molecules [33]. Conversely, beta oscillation prevalence is likely due to poor bulbar activation (related to a low flow rate), as it has been shown that the beta oscillation is favored by low odor concentrations [32] and low vapor-pressure molecules [33]. Similarly, at the M/T cell level, changes in odor responsiveness as a function of nasal flow rate may also be attributed to the level of bulbar activation. Finally, we observed that spike phase locking to LFP oscillations was also modified as a function of the flow rate condition (Fig. 3). A high flow rate improved spike phase locking to gamma, whereas a low flow rate improved spike phase locking to beta. Different authors

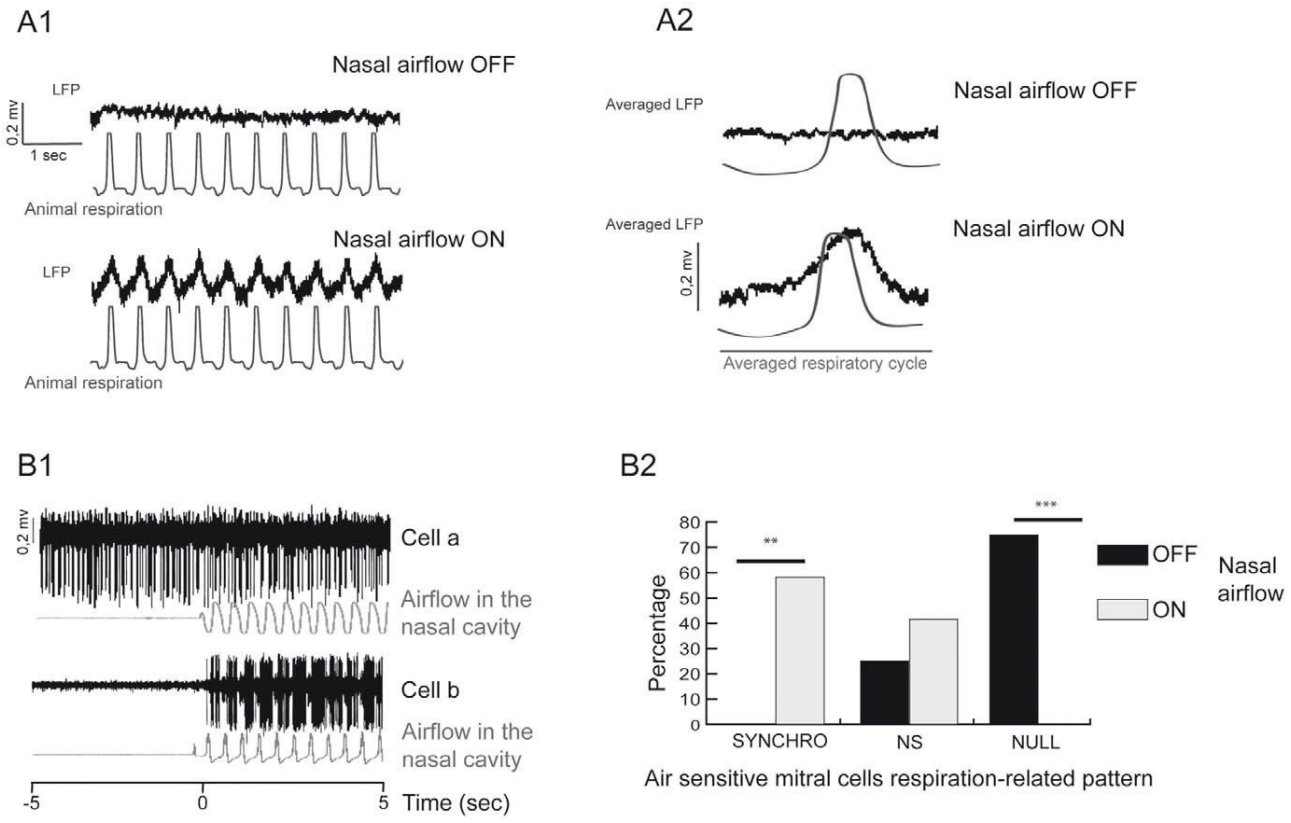


Figure 4. Nasal airflow (without any odor) imposes a respiration-related rhythm. A1) Dark traces: examples of field potentials recorded in the mitral cell layer when airflow was OFF (top) and ON (bottom). Gray traces: animal respiratory signal measured at the tracheal cannula. A2) Field potentials averaged over the respiratory cycle when airflow was OFF (top) and ON (bottom). B1) Forty five mitral cells were recorded under nasal airflow ON and OFF conditions. Raw data filtered at 300–3000 Hz of: an air-insensitive cell (a) and an air-sensitive cell (b). Bottom trace: airflow in the nasal cavity (500 ml/min) recorded at the nostril entrance. Nasal airflow was simulated at time 0. B2) Percentages of respiration-related (SYNCHRO), respiration non-related (NS) and null activity (NULL) patterns in air-sensitive cells when airflow was OFF (black) and ON (gray) in the nasal cavity (n = 12). Of these 12 cells, seven shifted from the NULL to SYNCHRO pattern, two from the NULL to NS and three from NS to NS (with a change in spike rate). Statistical test: Chi^2, **$p < 0.01$, ***$p<0.001$.
doi:10.1371/journal.pone.0016445.g004

have suggested that spike phase locking to LFP oscillations is a key parameter in olfactory coding, at least in the honeybee (for review, see [34]) and fish [35]. If, as we report, an odorant can evoke different phase locking and LFP oscillatory patterns according to nasal flow rate and the animal's sniffing dynamics, then such hypotheses should be reformulated.

Our finding that OB activity is modified by nasal airflow variation raises a new question: Do the observed modifications simply reflect the differential ORN activation due to air pressure variation, or are they due to variations in odorant stimulation because of flow rate variations? Unfortunately, odors cannot be delivered without airflow into the nasal cavity, making it impossible to directly answer this question. Nevertheless, some clues can be found in our data. First, we observed that M/T cells, in which the response to odors changed with flow rate, were not systematically those cells whose spontaneous activity was modified by flow rate (Figure S1). Second, slow LFP modulation was not modified by flow rate when no odor was delivered. Third, even with flow rate modification, gamma or beta oscillations were never evoked without odor. It thus seems reasonable to assume that the modifications in odor response we observed were not the only consequence of air pressure variation, but rather such modifications are likely due to both variations in nasal airflow pressure and odorant stimulation. If nasal flow rate variation affects odorant stimulation, it can do it in different ways: first by changing odorant concentration and second by modifying odorant migration through the nasal cavity. Further studies will next be required to specify the respective implication of each of these parameters by using both a systematic panel of odorant concentrations and a panel of odorants with different physico-chemical properties.

Functional implications for odor perception

By demonstrating that nasal flow rate induced modifications in bulbar network activity, M/T single cell activity and spike phase locking to LFP, we have presented novel evidence showing that nasal airflow is a key parameter to consider when studying olfactory coding. This result leads to two questions. First, what allows perception stability? Indeed, it has been recently shown that even though glomerular maps are modified by odorant concentration, animal odor perception remains stable [36]. An interesting explanation can be found in Bathellier et al. [37]. They showed that relevant information for odor coding is contained in mitral cell ensemble activity which is robust to changes in sniffing frequency. We could consider the possibility that such a coding scheme should also be robust to changes in flow rate variations.

Second, what is the role of respiratory dynamics in perception? Different authors have considered respiratory dynamics not only as the odorant molecules vector but also as an integral part of the

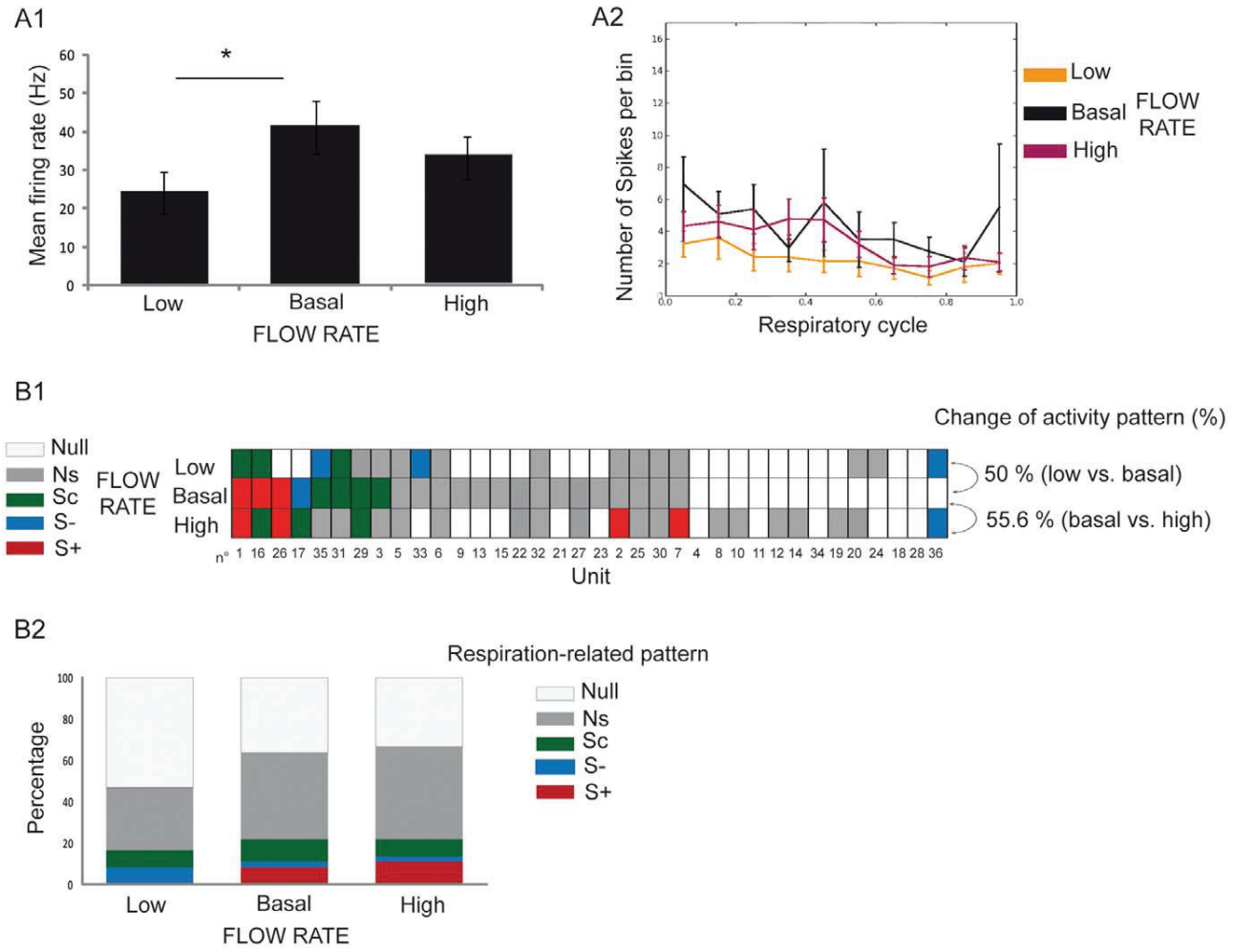


Figure 5. Spontaneous activity of OB units is modified by nasal flow rate. Thirty six mitral cells were recorded under the three flow rate conditions. A1) Mean instantaneous frequency rate (± SEM) under each flow rate condition (n = 36). Paired t-test, *$p<0.05$. A2) Mean instantaneous frequency (± SEM) as a function of respiratory cycle under the three flow rate conditions (low flow rate: orange, basal flow rate: black, and high flow rate: purple). B1) Matrix representing respiration-related spontaneous patterns of each cell recorded under the three flow rate conditions. Each line represents a flow rate condition, and each column represents a unit. A color was attributed to each pattern: excitatory synchronized (S+, red), suppressive synchronized (S−, blue), complex synchronized (Sc, green), respiration non-related (NS, gray) and null activity (NULL, light gray). Cells are ordered according to their respiratory-related pattern at basal flow rate. The percent of change in activity pattern represents the percent of units exhibiting a different pattern under the two flow rate conditions B2). Percentages of each spontaneous activity pattern as a function of flow rate condition (n = 36). Low and high nasal flow rate conditions were compared to the basal flow rate. Statistical test: Chi^2.
doi:10.1371/journal.pone.0016445.g005

olfactory percept [38,39]. As demonstrated in humans, there are fast adjustments of sniff volume depending on odorant concentration [40]. These fast modulations of respiratory dynamics suggest that olfactomotor control could be similar to that of vision or audition [40]. Variations in sniff parameters would serve to optimize the transport of odorant molecules along the OE pathway [41,42], similar to how eye movements serve to allow acute visual perception [43].

Materials and Methods

Preparation and recording

Male Wistar rats (200–450 g) obtained from Janvier (Le Genest-Saint-Isle, France) were anesthetized with urethane (1.5 mg/kg, i.p., with additional supplements as needed) and placed in a stereotaxic apparatus. LFP oscillations were used to monitor anesthesia depth. Animals were placed on a heating pad to maintain constant body temperature.

Ethics Statement. All surgical procedures were conducted in strict accordance with the European Community Council directive of November 24, 1986 (86/609/EEC), those of the French Ethical Committee and French Legislation and received approval from the Lyon 1 University Ethics Committee (Direction of veterinary service # 69387473).

Tracheotomy. Once all pain reflexes were abolished, a tracheotomy was performed by inserting a first cannula into the trachea, which allowed the rat to breathe freely (catheter Biotrol, int. 1.57 mm, ext. 2.08 mm, tracheal cannula in Fig. 6). A second cannula was then inserted rostrally through the larynx to the postnasal cavity to allow air to be pushed and pulled through the nasal cavity (catheter Vygon, Venolux 247, int. 0.8 mm, nasal cannula in Fig. 6).

Electrophysiological recordings. The dorsal region of the OB was exposed. Bulbar activity was recorded as a broadband signal (0.1 Hz to 5 kHz) using 16-channel silicon probes (NeuroNexus Technologies, Ann Arbor, MI) with a homemade 16-channel DC amplifier. Data were digitally sampled at 10 kHz and acquired with a PC using an IOTech acquisition system (Wavebook, IOTech Inc., Cleveland, OH). Probes were placed in the lateral or medial part of the OB at such a depth that the maximum number of channels could be located within, or close to, the mitral cell layer. The mitral cell layer was located by a set of criteria: LFP waveform, magnitude of unit action potentials and the inability to record spikes from the granule cell layer. Recordings were performed in the whole antero-posterior axis of the OB.

Odors. Odors (Sigma Aldrich, Fluka) were delivered in a randomized series through a dilution olfactometer (400 ml/min). The odors were isoamyl acetate (ISO), 2-heptanone (K07), 1-decanol (A10) and p-Cymen (CYM). We chose to stimulate animals with several odors in order to increase the probability of cell responses. All odors were delivered in front of the animal's nose at a fraction of 18.10^{-2} of the saturated vapor pressure. The time delay between each odor presentation was at least 1 min. The recording protocol was as follows: 5 s of spontaneous activity, 5 s of odor-evoked activity and 5 s of post-stimulus activity.

Protocols for simulated airflow variations. Airflow was measured by fast response time airflow sensors (bidirectional micro bridge mass airflow sensor, AWM 2000 series, Honeywell®). This setup is extensively described in [44]. We used two sensors (see Fig. 6), one placed in front of the tracheal cannula to measure the animal's respiration and another placed at the entry of the nostril to measure airflow circulating through the nasal cavity.

To simulate respiratory cycles, we used a homemade apparatus that allows the reproduction of both inhalation and exhalation phases. The animal's respiratory signal (collected at the tracheal cannula) was sent to the respiratory signal simulator, which in turn sent a simulated airflow toward the nasal cavity through the nasal cannula (see Fig. 6). Imposed airflow through the nasal cavity was deodorized by passing through an activated carbon filter device (Carbon-Cap ^{tm} 75, Whatman filter, Bioblock). The whole system was based on a proportional-integral-derivative (PID) controller

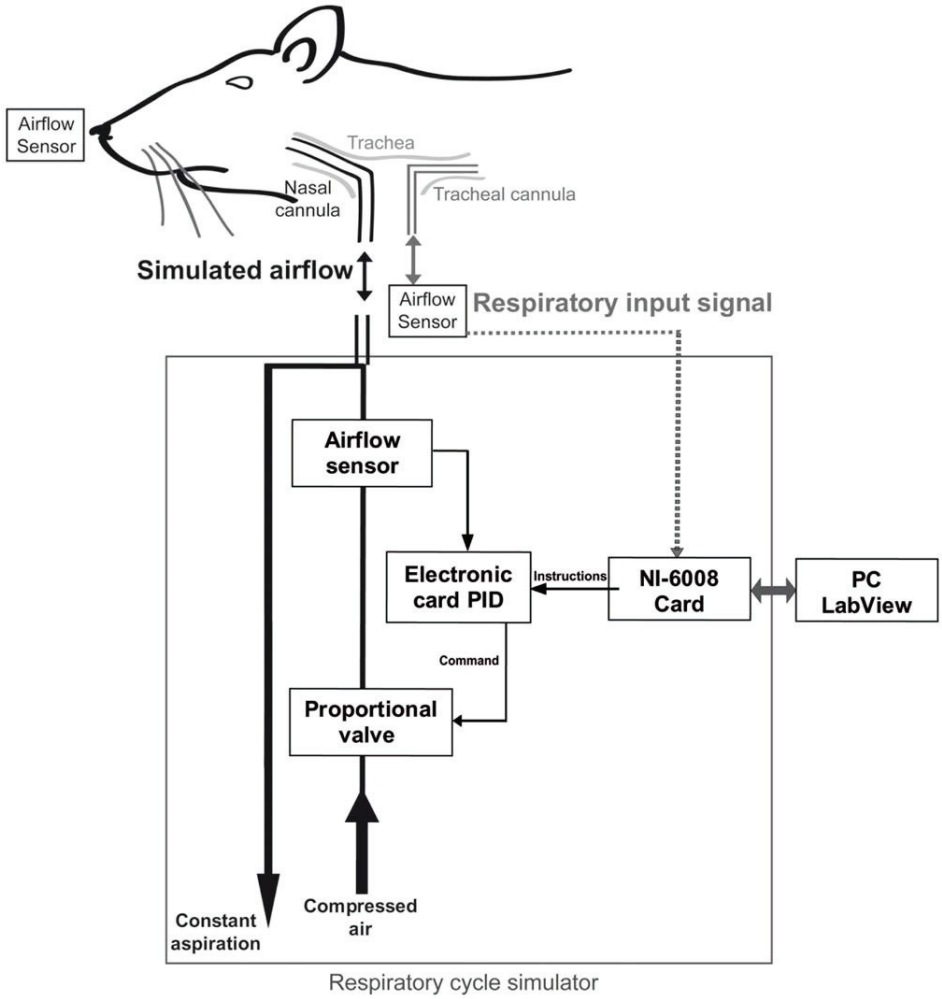


Figure 6. Respiratory cycle simulator. This apparatus consists of an electronic part (PID card, airflow sensor and proportional valve), an acquisition card (NI-6008 analog input/output) and a PC (software under LabView®). Using a constant aspiration and a compressed air input passing through the system allowed the simulation of both inhalation and exhalation phases of the respiratory cycle. The simulated airflow was directly sent to the nasal cavity via a nasal cannula. The tracheal cannula allowed the animal to freely breathe and was used to acquire the animal's respiratory signal.
doi:10.1371/journal.pone.0016445.g006

composed of an electronic card, a miniature proportional valve (VSO® model, Parker Precision Fluidics) and an air flow sensor (micro bridge mass airflow sensor, AWM 40000 series, Honeywell®). The electronic card was controlled via an analog data acquisition card (National Instruments® NI-USB 6000 series). This card was connected to a PC, and software developed under LabView® was designed to perform several tasks. The user was able to choose the simulated airflow parameters (time course and rate). To maintain conditions as physiological as possible, the simulated airflow was synchronized to the tracheal respiratory signal. In some cases, animal respiration was too irregular to permit the device to keep the synchrony between both signals (i.e., the simulated nasal airflow and animal respiration). We thus discarded trials in which both signals were not synchronized. To estimate the synchronization between simulated nasal airflow and animal respiration, we measured the delay between both signals at the inspiration/expiration transition (I/E) points. We considered both signals to be synchronized when the shift was $<10\%$ of the respiratory cycle. In selected trials, the shift was an average 4.63% ($\pm 3.12\%$) of the respiratory cycle.

Since the aim of this work was to study the influence of airflow variation, we chose to impose three different nasal airflow rates: low (200 ml/min), basal (500 ml/min) and high (800 ml/min) without varying any other parameter of the respiratory signal. These values refer to the maximum flow rate for the respiratory cycle. A 500 ml/min flow rate was chosen as basal because it reproduced the bulbar LFP signal in response to ISO that is typically recorded under the anesthetized non-tracheotomized condition [21]. This basal flow rate was adjusted to 500 ml/min ± 50 ml/min depending on the animal state. The three flow rates employed corresponded to the physiological scale in rat measured in behaving animals [1]. To determine how nasal airflow itself could affect olfactory bulb activity, we tested the effect of nasal airflow presence (nasal airflow ON, 500 ml/min, without any odor, modulated at animal respiratory frequency) and absence (nasal airflow OFF) on olfactory bulb activity. In all of these trials, airflow was discontinuous and exactly reproduced animal's breathing frequency. To ensure us that imposed airflow in the nasal cavity was completely deodorized, we included a blank trial in each recording session. We never observed any bulbar response (neither LFP nor mitral cell activity) to the blank. We also tested, on 3 additional rats, the effect of a continuous nasal airflow at 200, 500 or 800 ml/min.

Data processing

All data processing was performed using Openelectrophy open-access homemade software [45].

Respiratory signal. An important feature of the olfactory signal is its temporal correlation with breathing. We developed a method to represent data as a function of the respiratory phase [44]. Briefly, the recorded respiratory signal was processed to extract each respiratory epoch. The time component of these periods was then converted into a circular phase component defined between 0 and 1, which represented the beginning of the inspiration and end of the expiration, respectively. As a result, electrophysiological signals were no longer represented as a function of time but as a function of respiratory phase. The main advantage of this method is that the phase representation was common to all trials, as opposed to time representation. Electrophysiological recordings were analyzed relative to the respiratory cycle and in particular to the transition points between inhalation and exhalation (I/E). I/E points were automatically detected as zero-crossings of the respiratory signal, corresponding to the point of null airflow of the rising phase.

LFPs. Wavelet transform LFPs were obtained by band-pass filtering the recorded signal at 5–200 Hz. To preserve both time and frequency information, we used a time-frequency representation based on the continuous wavelet transform method.

Wavelet ridge extraction: We previously developed an algorithm [46] to extract phase information from the identified oscillations in the signal. Briefly, for each frequency band of interest, we computed the mean and standard deviation (SD) of the time-frequency map and defined the threshold as the mean +5 SDs of the time-frequency amplitude contained in the pre-stimulus period (between 0 and 5 s). These thresholds were used to define time and frequency boxes centered on points of maximum amplitude in the signal, bounded by small time and frequency ranges. Finally, we ran a high resolution Morlet's complex wavelet transformation on each box. Ridges were extracted on a Morlet scalogram time frequency map. Each time frequency ridge line represented all parameters of one oscillation (phase, frequency, amplitude, starting and ending times) as a function of time.

Spikes. Spike sorting: Signals from individual electrodes were amplified (gain $1000\times$) and filtered from 300 to 5000 Hz. Multi-unit activity consisted of a few neurons on each electrode. We chose to use only the well-discriminated units (with a signal-to-noise ratio $\geq 5{:}1$) and to sort cells according to their spike amplitudes. We verified that all sorted cells exhibited a minimal 4 ms refractory period. Consequently, the number of units retained for analysis was restricted to 1–3 units per channel. We preferred to use a very strict procedure, which resulted in a limited number of units but was also very safe. With this conservative procedure, we were very confident in the quality of the sorting; all units were well isolated, and there were no duplicates.

Respiratory patterns: As previously described [47], M/T cell activity is well characterized as a function of its temporal pattern along the respiratory cycle. To evaluate such patterns, the time occurrence of each spike was converted into a respiratory phase (0–1). All data were plotted as histograms (divided into 20 bins) that represented the spike rate along the respiratory cycle. Histograms were classified into different types based on the classification described in [47]. For the present study, we reduced this classification to four types: i) *non-synchronized patterns (NS)*, characterized by a uniform distribution of spiking activity along the respiratory cycle; ii) *excitatory-simple-synchronized patterns (S+)*, presenting a single increase in firing activity along the respiratory cycle; iii) *suppressive-simple-synchronized patterns (S−)*, presenting a single decrease or stop in firing activity along the respiratory cycle; and iv) *complex-synchronized patterns (Sc)*, exhibiting multiple firing frequency changes along the respiratory cycle. A period with no or very few spikes during the considered epoch was classified as *NULL*.

Spike-LFP phase coupling. Our wavelet ridge-based analysis method of LFPs allowed an accurate estimation of the oscillation phase. An absolute phase was assigned to each action potential that occurred during an oscillatory epoch. The mean distribution of action potentials relative to the phase of the LFP oscillation (beta or gamma) was represented by phase histograms (23 bins), where the peak and trough of the wave were assigned to 0 and pi, respectively. From these histograms, circular mean, deviation and dispersion were calculated.

Statistics. Statistical tests were performed using Excel, Statview software or R combined with Python script. The level of significance was set at $p<0.05$ for all statistical tests ($p<0.05$ *, $p<0.01$ ** and $p<0.001$ ***).

LFP: LFP spontaneous slow modulation was calculated from the difference between the maximum and minimum points on each averaged LFP signal relative to the respiratory cycle. For fast LFP

oscillations, average duration, frequency, amplitude and number of oscillatory bursts (defined as the mean number of detected oscillatory bursts per electrode under each flow rate condition) in the OB were compared between flow rate conditions using the Wilcoxon paired test. For all analyses, oscillation characteristics at basal flow rate were taken as the reference point for comparisons.

Spikes: First, M/T cell instantaneous frequency discharges were compared between the three flow rate conditions using a paired t-test. For each cell, instantaneous frequency discharge at the basal flow rate was taken as the reference point for comparisons. Second, distribution of M/T cell instantaneous frequency along the respiratory cycle was compared between the three flow rate conditions using the Equal Kappa test. Third, the probability of M/T cell respiration-related patterns were compared between flow rate conditions during spontaneous and odor-evoked activities using a Chi^2 test. M/T cell activity patterns were also compared in nasal airflow ON vs. OFF conditions using a Chi^2 test.

Spikes-LFP phase coupling: Rayleigh's uniformity test was used to calculate the probability that the spikes were uniformly distributed throughout the entire duration of an oscillatory cycle (null hypothesis). The circular Equal Kappa test was used to test the difference in spike distribution relative to oscillation cycle between the nasal flow rate conditions.

Supporting Information

Figure S1 Matrices of spontaneous and odor-evoked activities of OB units. A) Matrix representing respiration-related spontaneous and odor-evoked patterns of each cell recorded under the three flow rate conditions. Each line represents a flow rate condition, and each column represents a unit. A color was attributed to each pattern: excitatory synchronized (S+, red), suppressive synchronized (S-, blue), complex synchronized (Sc, green), respiration non-related (NS, gray) and null activity (NULL, light gray), ordered by cell. B) Matrix representing spontaneous and odor-evoked instantaneous frequency of each cell recorded under the three flow rate conditions. Each line represents a flow rate condition, and each column represents a unit. Gray scale was used to represent firing rate from <20 Hz to >80Hz, ordered by cell.
(TIF)

Figure S2 Continuous nasal airflow does not induce respiratory modulation. Example of LFP signal recorded in different airflow conditions from left to right: nasal airflow OFF, continuous 200 ml/min, continuous 500 ml/min and continuous 800 ml/min. LFP signals are averaged over the respiratory cycle. Gray traces: averaged respiratory cycle measured at the tracheal cannula.
(TIF)

Acknowledgments

We would like to thank Virginie Briffaud, Frederic Esclassan, Nicolas Fourcaud-Trocmé and Philippe Litaudon for their helpful comments on the manuscript.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: EC CA MT BM NB SG. Performed the experiments: EC. Analyzed the data: EC NB. Contributed reagents/materials/analysis tools: EC SG BM MT NB. Wrote the paper: EC NB.

References

1. Youngentob SL, Mozell MM, Sheehe PR, Hornung DE (1987) A quantitative analysis of sniffing strategies in rats performing odor detection tasks. Physiol Behav 41: 59–69.
2. Wesson DW, Donahou TN, Johnson MO, Wachowiak M (2008) Sniffing behavior of mice during performance in odor-guided tasks. Chem Senses 33: 581–596.
3. Kepecs A, Uchida N, Mainen ZF (2007) Rapid and precise control of sniffing during olfactory discrimination in rats. J Neurophysiol 98: 205–213.
4. Grosmaitre X, Santarelli LC, Tan J, Luo M, Ma M (2007) Dual functions of mammalian olfactory sensory neurons as odor detectors and mechanical sensors. Nat Neurosci 10: 348–354.
5. Mozell MM (1964) Evidence for sorption as a mechanism of the olfactory analysis of vapours. Nature 203: 1181–1182.
6. Mozell MM (1970) Evidence for a chromatographic model of olfaction. J Gen Physiol 56: 46–63.
7. Kent PF, Mozell MM, Murphy SJ, Hornung DE (1996) The interaction of imposed and inherent olfactory mucosal activity patterns and their composite representation in a mammalian species using voltage-sensitive dyes. J Neurosci 16: 345–353.
8. Scott-Johnson PE, Blakley D, Scott JW (2000) Effects of air flow on rat electroolfactogram. Chem Senses 25: 761–768.
9. Scott JW, Acevedo HP, Sherrill L (2006) Effects of concentration and sniff flow rate on the rat electroolfactogram. Chem Senses 31: 581–593.
10. Mombaerts P, Wang F, Dulac C, Chao SK, Nemes A, et al. (1996) Visualizing an olfactory sensory map. Cell 87: 675–686.
11. Nagao H, Yamaguchi M, Takahash Y, Mori K (2002) Grouping and representation of odorant receptors in domains of the olfactory bulb sensory map. Microsc Res Tech 58: 168–175.
12. Imai T, Sakano H (2007) Roles of odorant receptors in projecting axons in the mouse olfactory system. Curr Opin Neurobiol 17: 507–515.
13. Spors H, Grinvald A (2002) Spatio-temporal dynamics of odor representations in the mammalian olfactory bulb. Neuron 34: 301–315.
14. Spors H, Wachowiak M, Cohen LB, Friedrich RW (2006) Temporal dynamics and latency patterns of receptor neuron input to the olfactory bulb. J Neurosci 26: 1247–1259.
15. Verhagen JV, Wesson DW, Netoff TI, White JA, Wachowiak M (2007) Sniffing controls an adaptive filter of sensory input to the olfactory bulb. Nat Neurosci 10: 631–639.
16. Oka Y, Takai Y, Touhara K (2009) Nasal airflow rate affects the sensitivity and pattern of glomerular odorant responses in the mouse olfactory bulb. J Neurosci 29: 12070–12078.
17. Sobel EC, Tank DW (1993) Timing of odor stimulation does not alter patterning of olfactory bulb unit activity in freely breathing rats. J Neurophysiol 69: 1331–1337.
18. Bhalla US, Bower JM (1997) Multiday recordings from olfactory bulb neurons in awake freely moving rats: spatially and temporally organized variability in odorant response properties. J Comput Neurosci 4: 221–256.
19. Pager J (1985) Respiration and olfactory bulb unit activity in the unrestrained rat: statements and reappraisals. Behav Brain Res 16: 81–94.
20. Kay LM, Laurent G (1999) Odor- and context-dependent modulation of mitral cell activity in behaving rats. Nat Neurosci 2: 1003–1009.
21. Buonviso N, Amat C, Litaudon P, Roux S, Royet JP, et al. (2003) Rhythm sequence through the olfactory bulb layers during the time window of a respiratory cycle. Eur J Neurosci 17: 1811–1819.
22. Cenier T, David F, Litaudon P, Garcia S, Amat C, et al. (2009) Respiration-gated formation of gamma and beta neural assemblies in the mammalian olfactory bulb. Eur J Neurosci 29: 921–930.
23. Adrian ED (1942) Olfactory reactions in the brain of the hedgehog. J Physiol 100: 459–473.
24. Carey RM, Verhagen JV, Wesson DW, Pirez N, Wachowiak M (2009) Temporal structure of receptor neuron input to the olfactory bulb imaged in behaving rats. J Neurophysiol 101: 1073–1088.
25. Macrides F, Chorover SL (1972) Olfactory bulb units: activity correlated with inhalation cycles and odor quality. Science 175: 84–87.
26. Onoda N, Mori K (1980) Depth distribution of temporal firing patterns in olfactory bulb related to air-intake cycles. J Neurophysiol 44: 29–39.
27. Ravel N, Caille D, Pager J (1987) A centrifugal respiratory modulation of olfactory bulb unit activity: a study on acute rat preparation. Exp Brain Res 65: 623–628.
28. Sobel N, Prabhakaran V, Desmond JE, Glover GH, Goode RL, et al. (1998) Sniffing and smelling: separate subsystems in the human olfactory cortex. Nat 392: 282–284.
29. Litaudon P, Amat C, Bertrand B, Vigouroux M, Buonviso N (2003) Piriform cortex functional heterogeneity revealed by cellular responses to odours. Eur J Neurosci 17: 2457–2461.
30. Fontanini A, Spano P, Bower JM (2003) Ketamine-xylazine-induced slow (<1.5 hz) oscillations in the rat piriform (olfactory) cortex are functionally correlated with respiration. J Neurosci 23: 7993–8001.
31. Duchamp-Viret P, Kostal L, Chaput M, Lánsky P, Rospars J (2005) Patterns of spontaneous activity in single rat olfactory receptor neurons are different in normally breathing and tracheotomized animals. J Neurobiol 65: 97–114.

32. Neville KR, Haberly LB (2003) Beta and gamma oscillations in the olfactory system of the urethane-anesthetized rat. J Neurophysiol 90: 3921–3930.
33. Cenier T, Amat C, Litaudon P, Garcia S, Lafaye de Micheaux P, et al. (2008) Odor vapor pressure and quality modulate lfp oscillatory patterns in the olfactory bulb of anesthetized rat. Eur J Neurosci 27: 1432–1442.
34. Laurent G, Stopfer M, Friedrich RW, Rabinovich MI, Volkovskii A, et al. (2001) Odor encoding as an active, dynamical process: experiments, computation, and theory. Annu Rev Neurosci 24: 263–297.
35. Friedrich RW, Habermann CJ, Laurent G (2004) Multiplexing using synchrony in the zebrafish olfactory bulb. Nat Neurosci 7: 862–871.
36. Homma R, Cohen LB, Kosmidis EK, Youngentob SL (2009) Perceptual stability during dramatic changes in olfactory bulb activation maps and dramatic declines in activation amplitudes. Eur J Neurosci 29: 1027–1034.
37. Bathellier B, Buhl DL, Accolla R, Carleton A (2008) Dynamic ensemble odor coding in the mammalian olfactory bulb: sensory information at different timescales. Neuron 57: 586–598.
38. Mainland J, Sobel N (2006) The sniff is part of the olfactory percept. Chem senses 31: 181–196.
39. Kepecs A, Uchida N, Mainen ZF (2006) The sniff as a unit of olfactory processing. Chem Senses 31: 167–179.
40. Johnson BN, Mainland JD, Sobel N (2003) Rapid olfactory processing implicates subcortical control of an olfactomotor system. J Neurophysiol 90: 1084–1094.
41. Schoenfeld TA, Cleland TA (2005) The anatomical logic of smell. Trends Neurosci 28: 620–627.
42. Schoenfeld TA, Cleland TA (2006) Anatomical contributions to odorant sampling and representation in rodents: zoning in on sniffing behavior. Chem Senses 31: 131–144.
43. Pritchard RM (1961) Stabilized images on the retina. Sci Am 204: 72–78.
44. Roux SG, Garcia S, Bertrand B, Cenier T, Vigouroux M, et al. (2006) Respiratory cycle as time basis: an improved method for averaging olfactory neural events. J Neurosci Methods 152: 173–178.
45. Garcia S, Fourcaud-Trocmé N (2009) Openelectrophy: an electrophysiological data- and analysis-sharing framework. Front Neuroinformatics 3: 14.
46. Roux SG, Cenier T, Garcia S, Litaudon P, Buonviso N (2007) A wavelet-based method for local phase extraction from a multi-frequency oscillatory signal. J Neurosci Methods 160: 135–143.
47. Chaput MA, Buonviso N, Berthommier F (1992) Temporal patterns in spontaneous and odour-evoked mitral cell discharges recorded in anaesthetized freely breathing animals. Eur J Neurosci 4: 813–822.

Figure S1

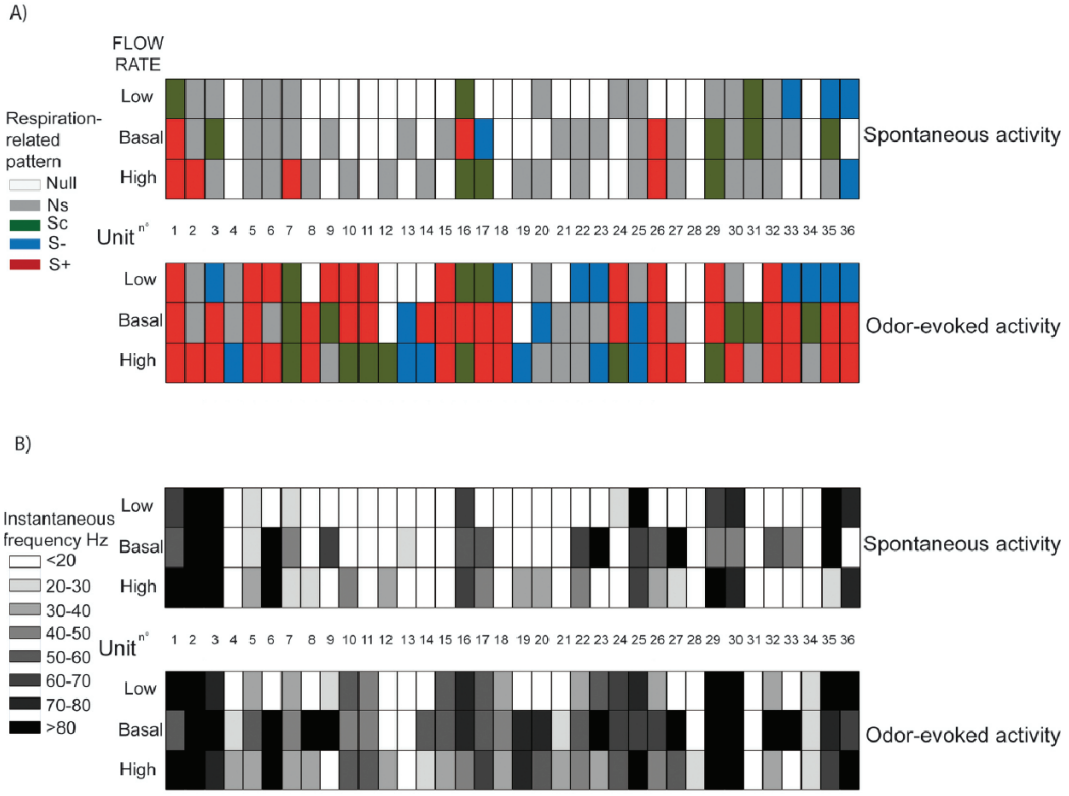
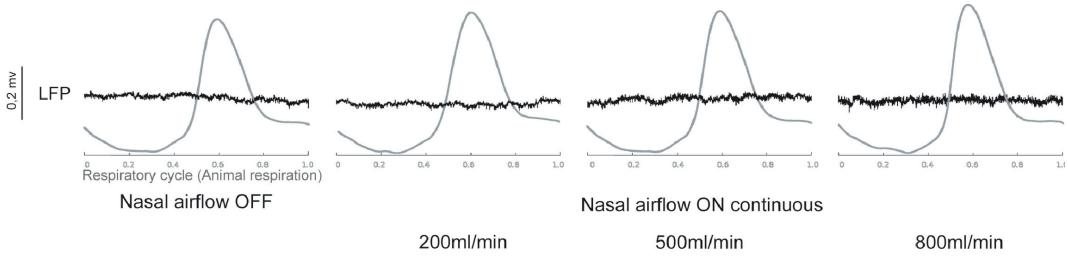


Figure S2



3.3.2 Effets conjoints du débit et de la fréquence respiratoire

3.3.2.1 Contexte et résumé

Un animal fait sans cesse varier sa respiration, tant en fréquence qu'en débit. Différents auteurs ont étudié séparément les effets de la fréquence et du débit sur l'activité du système olfactif. En ce qui concerne la fréquence, il a été montré que son augmentation conduisait à une réduction de l'amplitude des réponses de l'EO (Kent *et al.*, 1996) et de l'entrée glomérulaire (Verhagen *et al.*, 2007). Cette augmentation de fréquence conduit également à une diminution de la latence de réponse de l'EO (Wesson *et al.*, 2008a) et à une atténuation, voire une suppression, du rythme respiratoire à l'entrée du BO (Verhagen *et al.*, 2007). En ce qui concerne le débit, nous avons pu caractériser son impact sur l'activité bulbaire dans l'étude précédente. Si l'on reprend l'ensemble des études réalisées à la fois sur l'EO et sur le BO, il a été montré qu'une augmentation de débit conduisait à une augmentation de l'amplitude des réponses de l'EO (Scott *et al.*, 2006) et conférait une plus grande sensibilité aux odeurs de l'EO (Oka *et al.*, 2009) et des cellules M/P (Courtiol *et al.*, 2011a). Finalement, les augmentations de fréquence et de débit semblent donc avoir des effets opposés sur l'activité du système olfactif. Mais puisqu'un animal peut moduler à la fois la fréquence et le débit respiratoire, est-ce que les effets de l'un peuvent être compensés par les effets de l'autre ? Dans ce contexte, et parce qu'au niveau de la sortie du message bulbaire les effets de la fréquence n'ont été que peu décrits, nous avons voulu répondre plus spécifiquement à la question : est ce que les effets d'une augmentation de fréquence peuvent être compensés par les effets d'une augmentation de débit respiratoire ? Pour répondre à cette question, il nous fallait là encore contrôler précisément le flux d'air dans la cavité nasale. Grâce à notre simulateur de cycles respiratoires, nous avons imposé 6 fréquences respiratoires couplées à 2 débits respiratoires différents.

Nous avons tout d'abord observé qu'en régime respiratoire à haute fréquence, l'activité du BO liée à la respiration, bien qu'atténuée, était maintenue. Nous avons ensuite observé qu'une augmentation de débit pouvait partiellement compenser les effets d'une augmentation de fréquence respiratoire sur les activités rythmées du BO (modulation respiratoire, patterns de décharge synchronisés à la respiration des cellules M/P et occurrence des oscillations gamma). Nous avons également observé que seule une augmentation de débit pouvait réduire la latence de réponse du bulbe, nous plaçant à l'opposé des données de Wesson *et al.* (2009). Finalement, nous avons montré, que pour maintenir une forte relation entre activité du système olfactif et respiration, il nous fallait imposer un fort débit lorsque l'on augmentait la fréquence respiratoire. L'utilité d'un tel compromis n'est valide que si chez un animal vigile, fréquence et

débit varient de façon conjointe. Pour répondre à cette question, nous avons mis au point un système d'enregistrement non invasif de la respiration chez l'animal vigile. Nous avons montré qu'il existait une corrélation positive significative entre le débit respiratoire et la fréquence respiratoire. Nous démontrons donc qu'une stratégie de flairage permettant de maintenir une forte relation entre activité du système olfactif peut effectivement être utilisée par un animal qui se comporte. Cette étude met donc en avant l'importance pour le système olfactif de maintenir une forte relation avec la respiration et soulève la question du rôle de ce rythme dans le traitement de l'information olfactive.

3.3.2.2 Résultats (étude 2)

Les résultats de cette étude sont parus sous forme publiée :

Individual and synergistic effects of sniffing frequency and flow rate on olfactory bulb activity.

Courtiol E, Hegoburu C, Litaudon P, Garcia S, Fourcaud-Trocmé N, Buonviso N.

J Neurophysiol. 106:2813-24 (2011b)

3.3.2.3 Résultats complémentaires sur l'effet conjoint de la fréquence et du débit

J'ai également collaboré à un projet étudiant les effets conjoints du débit et de la fréquence respiratoire mais à un autre niveau d'activité du BO en utilisant une méthode d'imagerie par colorant sensible au voltage (voltage sensitive dye imaging VSD).
Cette étude a également été publiée, cette étude est disponible dans la partie annexes, page 194.

Faster, deeper, better: the impact of sniffing modulation on bulbar olfactory processing.

Esclassan F, **Courtiol E**, Thévenet M, Garcia S, Buonviso N, Litaudon P.

PLoS One. 7:e40927 (2012)

Les résultats de cette étude corroborent et complètent les données enregistrées grâce à l'électrophysiologie. Effectivement, nous avons enregistré, chez l'animal anesthésié, l'activité post-synaptique dans le BO dorsal en réponse à des odeurs sous différentes conditions de flairage. Le simulateur de cycles respiratoires a, comme dans les études précédentes, été utilisé afin d'imposer 5 fréquences respiratoires couplées à 3 débits respiratoires différents. L'une des données importantes qu'apporte l'imagerie est que l'on a accès à la fois à la composante tonique et à la composante phasique (liée à la respiration) de la réponse. Premièrement, nous avons montré que, comme pour les activités liées au rythme respiratoire enregistrées dans l'étude 2, la

composante phasique de la réponse glomérulaire pouvait suivre le rythme respiratoire jusqu'à de haute fréquence (10Hz). De plus, cette composante phasique est à la fois dépendante de la fréquence et du débit respiratoire puisqu'une augmentation de débit permet, en partie, de compenser l'atténuation à haute fréquence respiratoire. C'est également le cas, pour la composante tonique du signal. Exception faite que la composante tonique devient indépendante de la fréquence respiratoire lorsque le débit respiratoire est élevé. Cette étude a donc permis de révéler 1) que l'entrée bulbaire était bel et bien capable de suivre à haute fréquence respiratoire, 2) que la composante phasique de la réponse du signal VSD était dépendante à la fois de la fréquence et du débit respiratoire et 3) que la composante tonique, elle, à haut débit pouvait devenir indépendante de la fréquence respiratoire.

J Neurophysiol 106: 2813–2824, 2011.
First published September 7, 2011; doi:10.1152/jn.00672.2011.

Individual and synergistic effects of sniffing frequency and flow rate on olfactory bulb activity

Emmanuelle Courtiol, Chloé Hegoburu, Philippe Litaudon, Samuel Garcia, Nicolas Fourcaud-Trocmé, and Nathalie Buonviso

Centre de Recherche en Neurosciences de Lyon (CRNL) Equipe Olfaction: du codage à la mémoire, CNRS UMR 5292, INSERM U1028, Université Lyon 1, Lyon Cedex, France

Submitted 19 July 2011; accepted in final form 4 September 2011

Courtiol E, Hegoburu C, Litaudon P, Garcia S, Fourcaud-Trocmé N, Buonviso N. Individual and synergistic effects of sniffing frequency and flow rate on olfactory bulb activity. *J Neurophysiol* 106: 2813–2824, 2011. First published September 7, 2011; doi:10.1152/jn.00672.2011.—Is faster or stronger sniffing important for the olfactory system? Odorant molecules are captured by sniffing. The features of sniffing constrain both the temporality and intensity of the input to the olfactory structures. In this context, it is clear that variations in both the sniff frequency and flow rate have a major impact on the activation of olfactory structures. However, the question of how frequency and flow rate individually or synergistically impact bulbar output has not been answered. We have addressed this question using multiple experimental approaches. In double-tracheotomized, anesthetized rats, we recorded both the bulbar local field potential (LFP) and mitral/tufted cells' activities when the sampling flow rate and frequency were controlled independently. We found that a tradeoff between the sampling frequency and the flow rate could maintain olfactory bulb sampling-related rhythmicity and that only an increase in flow rate could induce a faster, odor-evoked response. LFP and sniffing were recorded in awake rats. We found that sampling-related rhythmicity was maintained during high-frequency sniffing. Furthermore, we observed that the covariation between the frequency and flow rate, which was necessary for the tradeoff seen in the anesthetized preparations, also occurred in awake animals. Our study shows that the sampling frequency and flow rate can act either independently or synergistically on bulbar output to shape the neuronal message. The system likely takes advantage of this flexibility to adapt sniffing strategies to animal behavior. Our study provides additional support for the idea that sniffing and olfaction function in an integrated manner.

olfaction; LFP; mitral cell; sniffing dynamics

JUST AS VISUAL PERCEPTION is dependent on eye movement, olfaction is dependent on the way that odors are sampled (i.e., respiration). Olfactory activity and odor-sampling behaviors maintain strong temporal relationships at multiple levels, including the olfactory receptors (Carey et al. 2009; Chaput 2000), glomerular activation maps (Spors and Grinvald 2002), mitral/tufted (M/T) cells (Chaput et al. 1992; Macrides and Chorover 1972; Margrie and Schaefer 2003; Onoda and Mori 1980; Sobel and Tank 1993), bulbar local field potential (LFP) (Adrian 1942; Buonviso et al. 2003), and the piriform cortex (Litaudon et al. 2003; Poo and Isaacson 2009; Wilson 1998). Odor sampling behavior is thus a key feature of olfactory perception (Mainland and Sobel 2006), and sniffing has been proposed to be an olfactory motor act (Johnson et al. 2003). If this is indeed the case, any variation in the sniffing frequency and/or flow rate should shape olfactory coding. Sniffing has been shown to be highly variable with respect to both the frequency (which ranges from 2 to 12 Hz) and the flow rate (Youngentob et al. 1987). Flow rate has been observed to impact both the olfactory epithelium (Kent et al. 1996; Mozell 1970; Scott-Johnson et al. 2000) and glomerular activity (Oka et al. 2009). Recently, we described (Courtiol et al. 2011) flow rate-induced modifications of bulbar activity. How variation in the sampling frequency impacts bulbar activity remains unclear. At least two factors could be modified by a high frequency. The first factor is the strength of the bulbar response, because a high sampling frequency results in a short bulbar activation period, as confirmed by the attenuation of the respiratory pattern of glomerular activation (Verhagen et al. 2007). The second factor that is likely modified by a high frequency is the latency of the bulbar response, because the high frequency increases the speed of odorant acquisition (Wesson et al. 2009). While the present study was under review, the effect of sampling frequency on M/T cell activity was described (Carey and Wachowiak 2011). However, the question of how the frequency and flow rate individually or synergistically impact bulbar output has not yet been addressed.

Our question was then two-fold: does a high sampling frequency modify the strength and/or latency of the bulbar response? If so, can a higher flow rate counterbalance the effects of a high frequency?

To precisely control both of the sampling parameters, we used an anesthetized, double-cannulated, tracheotomized rat experimental preparation. This preparation allowed flow rate and frequency to be independently controlled, which is not possible in awake animals. We found that a tradeoff between the sampling frequency and the flow rate resulted in the persistence of sampling-related activity in the olfactory bulb (OB), and only an increase in the flow rate could induce M/T cells to respond earlier. With the use of awake rats, we demonstrated that a similar covariation between the frequency and flow rate, which was necessary for the tradeoff observed in the anesthetized preparation, occurred in the behaving animal.

MATERIALS AND METHODS

Experiment 1: OB Activity Recording and Control of Sampling Parameters in Anesthetized Rats

Preparation and recording. Ten male Wistar rats (200–450 g), obtained from Janvier (Le Genest-Saint-Isle, France), were anesthe-

Address for reprint requests and other correspondence: E. Courtiol, Centre de Recherche en Neurosciences de Lyon (CRNL) Equipe Olfaction: du codage à la mémoire, CNRS UMR 5292, INSERM U1028, Université Lyon 1, 50 Ave. Tony Garnier, 69366 Lyon Cedex 07, France (e-mail: ecourtiol@olfac.univ-lyon1.fr).

0022-3077/11 Copyright © 2011 the American Physiological Society

tized with urethane (1.5 g/kg ip, with additional supplements as needed) and placed in a stereotaxic apparatus. Anesthesia was maintained by supplemental doses when necessary. LFP oscillations were used to monitor anesthesia depth. The animals were placed on a heating pad to maintain constant body temperature. All surgical procedures were conducted in strict accordance with the European Community Council directive of November 24, 1986 (86/609/EEC), and the guidelines of the French Ethical Committee and French Legislation, and surgical procedures received approval from the Lyon 1 University Ethics Committee (Direction of Veterinary Service #69387473).

TRACHEOTOMY. When all pain reflexes were abolished, a tracheotomy was performed by inserting the first cannula into the trachea, which allowed the rat to breathe freely. Next, a second cannula was inserted rostrally through the larynx into the postnasal cavity to allow air to be pushed and pulled through the nasal cavity.

ELECTROPHYSIOLOGICAL RECORDINGS. The dorsal region of the OB was exposed. Bulbar activity was recorded as a broadband signal (0.1–5 kHz) using 16-channel silicon probes (NeuroNexus Technologies, Ann Arbor, MI) and a homemade 16-channel direct current amplifier (gain 1,000×). Silicon probes (16-channel) were placed so that we could record both the M/T cell activity from the mitral cell layer and the maximum LFP amplitude in the granular cell layer. The mitral cell layer was located using the following criteria: LFP waveform, the magnitude of the unit action potentials, and the inability to record spikes from the granular cell layer. The granular cell layer was located by LFP waveform, as described by Buonviso et al. (2003). Recordings were performed in the whole anteroposterior axis of the OB. Data were digitally sampled at 20 kHz and acquired with a personal computer (PC) using a National Instruments (Austin, TX) acquisition card (BNC-2111).

ODORS. Odors (Sigma-Aldrich, St Louis, MO; Fluka, Germany) were delivered in a randomized series through a dilution olfactometer (400 ml/min). The odors were 2-heptanone (K07) and isoamyl acetate (ISO). The odors were delivered in front of the animal's nose at the proportion of 18% of the saturated vapor pressure. The time delay between each odor presentation was at least 1 min. The recording protocol was as follows: 5 s of spontaneous activity, 5 s of odor-evoked activity, and 5 s of poststimulus activity.

IMPOSED NASAL AIRFLOW. Airflow was measured using fast response-time airflow sensors. This setup has been described extensively by Roux et al. (2006). We used two sensors; the first, which was placed in front of the tracheal cannula, measured the animal's own respiration. The second sensor, which was placed at the entrance of the nostril, measured the airflow circulating through the nasal cavity. We thus recorded two airflow signals: the animal's own respiratory airflow and the imposed nasal airflow.

To simulate respiratory cycles, we used a homemade apparatus that allowed the reproduction of both the inhalation and exhalation phases (for more details, see Courtiol et al. 2011). Briefly, the animal's respiratory signal (collected at the tracheal cannula) was sent to the respiratory signal simulator, which in turn, sent a simulated sampling airflow toward the nasal cavity through the nasal cannula. The simulated sampling airflow in the nasal cavity could be controlled precisely in terms of frequency, flow rate, and synchronization (with respect to the animal's own respiration). To study the effects of variations in both the sampling frequency and flow rate, we chose to impose *1*) six different nasal airflow frequencies, i.e., 1 Hz, basal (which is the respiratory frequency of a urethane-anesthetized rat; mean = 2.3 Hz), 4 Hz, 6 Hz, 8 Hz, and 10 Hz, in a randomized procedure, and *2*) two nasal flow rates of 500 ml/min and 1,000 ml/min. Figure 1*A* shows the corresponding flow inspiration volumes. A 500-ml/min flow rate coupled with the basal frequency reproduced the bulbar LFP signal in response to ISO, which was usually recorded in the anesthetized, nontracheotomized condition (Buonviso et al. 2003). The flow rates and sampling frequencies used corresponded to rat physiological parameters (Youngentob et al. 1987).

Data processing. All data processing was performed using OpenElectrophy open-access homemade software (Garcia and Fourcaud-Trocmé 2009). OpenElectrophy is an open source and is freely available for download at http://neuralensemble.org/trac/OpenElectrophy.

RESPIRATORY SIGNAL. An important feature of the olfactory signal is its temporal correlation with breathing. Therefore, we developed a method for representing the data as a function of the respiratory phase (Roux et al. 2006). Briefly, the respiratory cycle was first divided into two periods: inspiration and expiration. The time component for these periods was then converted into a circular-phase component, defined between zero and one, where zero and one represent the beginning of inspiration and the end of expiration, respectively. This phase representation of the respiratory cycle was used as a normalized time basis (between zero and one) and permitted us to collect and analyze the results in a standardized data format across different recordings. The respiratory-phase computation was performed on both the animal's own respiration and the imposed nasal airflow (i.e., sampling cycles), which allowed us to compare the olfactory activity relative to either of these two signals.

LFPs. LFPs were obtained by band-passing the signal at 0–200 Hz.

• *Wavelet transform and wavelet ridge extraction for γ-oscillations*

To preserve both time and frequency information, we used a time-frequency representation (TFR) based on a continuous wavelet transform. We have developed an algorithmic procedure (Roux et al. 2007) to extract phase information from the oscillations identified in the signal. γ-Oscillations were easily and clearly discriminated in both the TFRs and the raw signals. A γ-burst was defined as a succession of at least three oscillation cycles. An absolute threshold was defined during the stimulus epoch for the 35- to 90-Hz band and for each electrode. This threshold was used to define the time and frequency boxes centered on the points of the maximum signal amplitude. Next, the time and frequency coordinates of all local maxima in the γ-band above this threshold were extracted. From each maximum, we computed the Morlet's complex wavelet transformation with high time resolution, both forward and backward, following the line of maximum energy. The computation stopped when the energy fell below the threshold. Therefore, for each maximum detected on the time-frequency map, we obtained, with high time resolution, a wavelet ridge, which was defined by its starting and ending times, instantaneous frequency, and instantaneous phase. Thus each γ-episode was characterized by the coordinates of its maximum (power and frequency) and its wavelet ridge (duration and frequency).

Statistical tests were performed using Excel and StatView software. The level of significance was set at $P < 0.05$ for all statistical tests.

The occurrence of γ-oscillations (defined as the probability of observing at least one γ-burst during odorant stimulation, irrespective of the number of γ-bursts) was calculated and compared between the sampling conditions using the χ^2 test. The average γ-burst duration, frequency, amplitude, and recurrence over successive sampling cycles (defined as the total number of oscillatory bursts/total number of sampling cycles) were calculated. These parameters were compared among the sampling conditions using two-way factorial ANOVA with the frequency and flow rate as factors. Post hoc analyses were performed using Student-Newman-Keuls test.

• *LFP sampling-related modulation*

In addition to γ-oscillations, LFP presents a slower component linked to the respiratory sampling rate (Buonviso et al. 2003). LFP sampling-related modulation occurrence was determined using fast Fourier transformations (FFTs), which are better suited for processing long signals. FFTs were performed during spontaneous and odor-evoked activities. The LFP sampling-related modulation was analyzed in two different ways. First, the amplitude of the sampling-related modulation was determined. LFP signals were averaged relative to the imposed sampling cycle. Then, the amplitude of the LFP sampling-related modulation was calculated as the difference between the maxima and the minima of each averaged LFP signal. Second, the cross-correlation coefficient between the LFP signal and the imposed

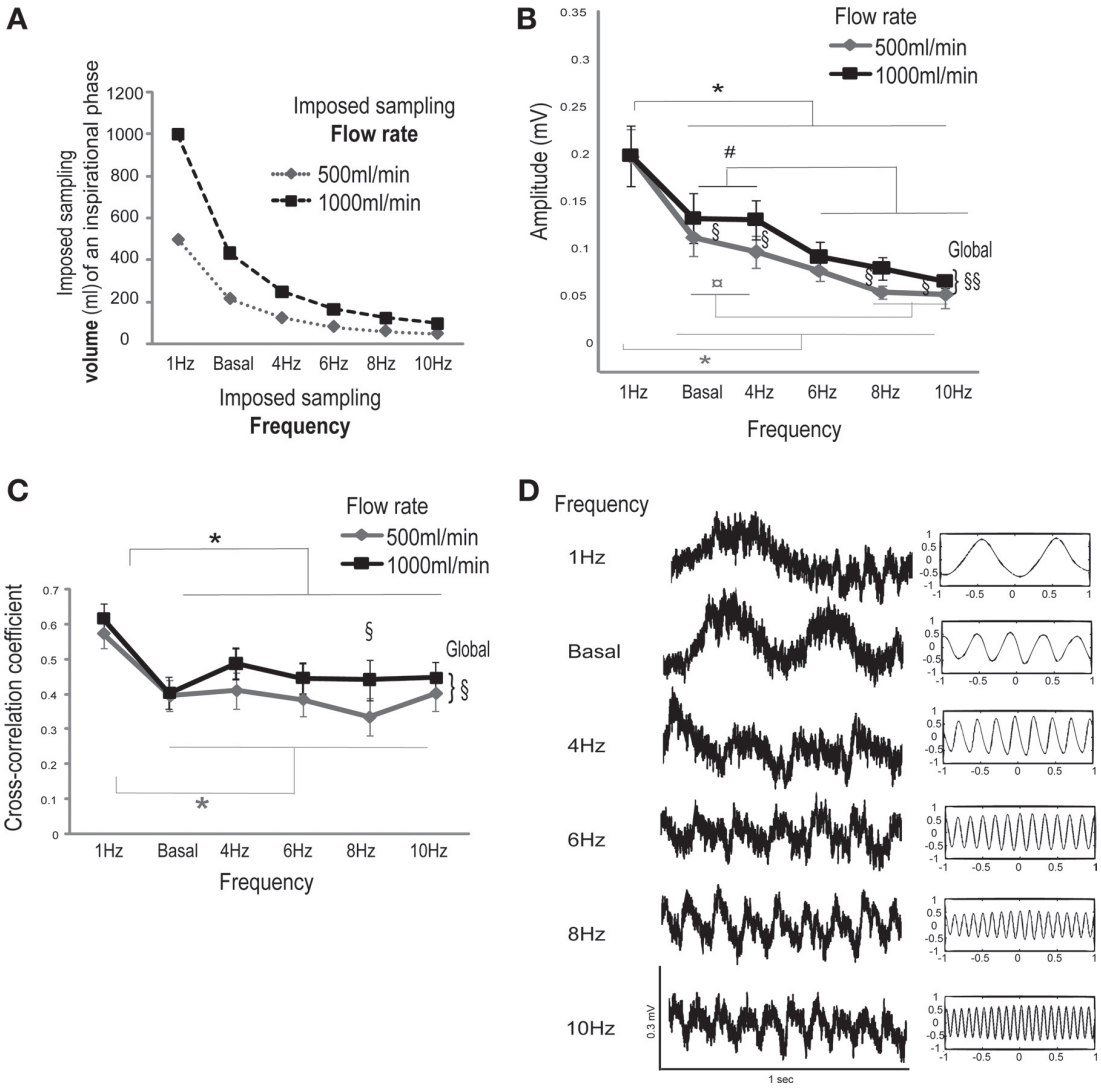


Fig. 1. Although attenuated, the local field potential (LFP) sampling-related rhythm persists at high sampling frequencies. *A*: imposed sampling conditions. Plots of the imposed sampling volumes of an inspiration as a function of the imposed frequency and flow rate. Six different nasal airflow frequencies of 1 Hz, basal frequency (which is the respiratory frequency of a urethane-anesthetized rat; mean = 2.3 Hz), 4 Hz, 6 Hz, 8 Hz, and 10 Hz and 2 nasal flow rates of 500 ml/min and 1,000 ml/min were imposed in a randomized procedure. *B*: plots of the mean amplitude of the LFP sampling-related modulation (±SE) as a function of the imposed frequency and flow rate. Gray, 500 ml/min flow rate; black, 1,000 ml/min flow rate. The number of trials for each flow rate and for each frequency was 19 (total = 228). Statistical analyses were performed using the repeated-measures ANOVA test, which revealed a global effect of the frequency; $P < 0.0001$. According to the Newman-Keuls post hoc test: *significant difference between 1 Hz and all other frequencies; #at 1,000 ml/min, there was no difference between basal and 4 Hz, but both were significantly different from 6 Hz, 8 Hz, and 10 Hz; ¤at 500 ml/min, there was no significant difference between basal and 4 Hz, but both were significantly different from 8 Hz and 10 Hz; §§global ANOVA effect of flow rate ($P < 0.01$). A post hoc Newman-Keuls test revealed a significant effect of the flow rate at basal, 4 Hz, 8 Hz, and 10 Hz (§) frequencies. *C*: mean cross-correlation coefficients (±SE) as a function of the imposed frequency and flow rate. The cross-correlation was assessed between the LFP sampling-related modulation and the imposed nasal airflow. Gray, 500 ml/min flow rate; black, 1,000 ml/min flow rate. The number of trials for each frequency and for each flow rate was 19. Statistical analyses were performed using repeated-measures ANOVA. The ANOVA revealed a global effect of frequency ($P < 0.001$). *significant difference between 1 Hz and all other frequencies when the Newman post hoc test was applied (*bottom*); § (*top*) global ANOVA effect of flow rate ($P < 0.05$). A post hoc Newman-Keuls test revealed a significant effect of the flow rate at 8 Hz (§ for both flow rate conditions). *D*, *left*: examples of raw data for the LFP recorded from the same channel under 6 different sampling frequencies at a flow rate of 1,000 ml/min. Note the decrease in the slow LFP modulation amplitude and its persistence across the frequencies. Cross-correlograms from the cross-correlation between the imposed sampling signals at 1,000 ml/min are presented on the *right*, and the corresponding raw data are on the *left*.

nasal airflow was measured. The cross-correlations between the imposed sampling nasal airflow and the LFP signals were determined according to the following equation

$$\frac{\langle (X - \langle x \rangle)(Y - \langle y \rangle) \rangle}{\sigma_x \sigma_y}$$

where x denotes the imposed sampling cycle, y is the LFP signal, $<>$ is the mean, and σ is the SD. Repeated-measures ANOVA, with the frequency and flow rate as factors, was used for comparisons of the LFP sampling-related modulation amplitude and the cross-correlogram coefficients. Post hoc analyses were performed using the Student-Newman-Keuls test.

SPIKES.

• *Spike sorting*

Spiking activity was extracted from individual electrodes using a band-pass filter (300–3,000 Hz). Multiunit activity consisted of a few

neurons on each electrode. We chose to use only well-discriminated units with a signal/noise ratio ≥5/1 and to sort cells according to their spike amplitude. Consequently, the number of units retained for analysis was restricted to 1–3 units/channel. We preferred to use a conservative criterion, which resulted in a limited number of units but was also highly reliable. This procedure has been described and illustrated in detail by Cenier et al. (2009).

• *Pattern classification*

In our preceding reports, the temporal patterns of M/T cell activity were classified according to the variations in the discharge rate with respect to the respiratory cycle (Buonviso et al. 1992; Cenier et al. 2009; Courtiol et al. 2011). Here, the imposed nasal airflow cycle was used as a time reference for pattern classification. Thus a pattern was classified as SYNCHRO when its spiking discharge presented synchronized activity relative to the imposed sampling cycle, as nonsynchronized pattern (NS) when it presented a uniform distribution of activity along the imposed sampling cycle, and as NULL when it exhibited only a few or no spikes. A M/T cell was considered responsive when the frequency rate or/and activity pattern changed from spontaneous activity to odor-evoked activity. Frequency change was considered as a response when mean and/or maximum frequency values changed by >2 SD between two conditions (Buonviso and Chaput 1990; Chaput et al. 1992).

• *Measurements and statistics*

Statistical tests were performed using Excel and StatView software. The level of significance was set at $P < 0.05$ for all statistical tests.

First, the percentages of odor-responsive M/T cells were calculated for each condition and compared using a χ^2 test. Second, the relative proportions of the different M/T cell patterns (SYNCHRO, NS, NULL) were compared among the sampling conditions during odor-evoked activities using a χ^2 test. Third, the latencies between the first spike and the first inspiration following odor onset were calculated and compared among the different sampling frequency conditions using two-way factorial ANOVA with the frequency and flow rate as factors. Post hoc analyses were performed using the Student-Newman-Keuls test.

Experiment 2: Respiration Recordings in Freely Moving Rats

Preparation and recording. Six male Long Evans rats (Janvier), weighing 250–300 g at the start of the experiment, were used. Food and water were available ad libitum during the experiment.

RESPIRATION. Respiratory behavior in freely moving rats was measured using whole-body plethysmography (emka Technologies, France) with the goal of disturbing rat behavior as little as possible. This setup has been described extensively by Hegoburu et al. (2011). Briefly, the plethysmograph is composed of two chambers: a subject chamber and a reference chamber. A differential pressure transducer (Model dpt, emka Technologies) connected to both chambers allows the measurement of pressure differences. This signal reflects the respiratory activity of the rat. The measured signal was amplified, digitally sampled at 1 kHz, and acquired with a PC using an acquisition card (MC-1608FS, Measurement Computing, Norton, MA).

PROTOCOL. It has been shown that animals increase their sniffing frequency during odor presentation (Wesson et al. 2008a), and they present a slow sniffing frequency at rest. For each rat, the respiration was recorded during 13 trials. K07 was presented 10 times for 20 s with an intertrial interval of 4 min. With the use of this protocol, we were able to record a large range of sniffing frequencies.

Data processing. All data processing was performed using OpenElectrophy homemade open-access software (Garcia and Fourcaud-Trocmé 2009). All signals and epochs (i.e., with or without odor) were stored in a Structured Query Language database. Measurements were performed as described in detail by Hegoburu et al. (2011).

RESPIRATORY SIGNAL. OpenElectrophy can automatically detect zero crossings of the respiratory signal, which correspond to the point of null airflow in the rising phase (Roux et al. 2006). The negative and positive phases corresponded to inspiration and expiration, respectively (see Fig. 5*B*). With the use of these phases, we had direct access to the frequency, inspiration time, expiration time, inspiration peak flow rate, and expiration peak flow rate. The peak flow rates and times were used to calculate the inspiration and expiration volumes, respectively.

MEASUREMENTS AND STATISTICS. Statistical tests were performed using Excel and StatView software. The level of significance was set at $P < 0.05$ for all tests. All respiratory cycles, where the peak flow rate, volume, or duration value of the inspiration or expiration phase were greater than the mean ± 2 SD, were discarded from analysis. Comparisons of the peak flow rates and volumes among the different sampling frequency conditions were performed using a factorial ANOVA with sampling frequency as the factor. More precisely, comparisons between the sampling frequency and the peak flow rate were performed for both the inspiration and expiration phases. Post hoc analyses were performed using the Student-Newman-Keuls test.

Experiment 3: OB Recording in Freely Moving Rats

Preparation and recording. ANIMAL PREPARATION. Two male Long-Evans rats (Janvier) were used; the rats weighed 270 g at the start of the experiment. Food and water were available ad libitum during the experiment.

Anesthesia was induced and maintained by intraperitoneal injections of Equithesin (a mixture of chloral hydrate and sodium pentobarbital, 3 ml/kg). A monopolar LFP recording electrode was positioned in the left OB near the mitral cell layer, which was located by its large, multiunit mitral cell activity (Martin et al. 2004). A connector was mounted on the skull (emka Technologies). The rats were then allowed to recover for 2 wk.

RESPIRATION RECORDINGS. Respiratory behaviors were acquired and computed as described in the second part of MATERIALS AND METHODS (Experiment 2*: respiration recordings in freely moving rats*).

TELEMETRY RECORDING OF OB LFP SIGNALS. To obtain access to both OB activity and sampling behavior, the rats were placed in the plethysmograph chamber. To prevent the possible loss of air tightness in the plethysmograph, the result of wired recordings, we used radiofrequency acquisition of the LFP signals (RodentPACK, emka Technologies). A transmitter (RodentPACK, emka Technologies) was connected to the head connector for the recording session (see Fig. 6*A*). LFP was acquired at 1 KHz. The transmitter was paired with a specific receiver card, and the receiver mainframe provided analog output to our computer via an acquisition card (MC-1608FS, Measurement Computing).

Data processing. LFPs. LFP signals were processed as described for anesthetized animals (MATERIALS AND METHODS, Experiment 1*: OB activity recording and control of sampling parameters in anesthetized rats*).

RESULTS

Two experimental preparations were used: a freely moving animal preparation and a double-tracheotomized, anesthetized animal preparation. We use the term "sniffing" to refer to the respiratory behavior recorded in freely moving animals, and "imposed sampling" refers to the imposed nasal airflow in anesthetized animals.

Experiment 1: Effects of Sampling Frequency and Flow-rate Variations on Bulbar Activity

Our aim in *Experiment 1* was to answer two questions: does a high sampling frequency modify the strength and/or latency of the bulbar response? If so, can a higher flow rate counterbalance the effects of high frequency?

In *Experiment 1*, 10 anesthetized rats were used. As shown in Fig. 1*A*, OB activity was recorded under six different imposed sampling frequencies: 1 Hz, basal (the animal's own respiratory frequency under urethane anesthesia; mean = 2.3 Hz ± 0.02), 4 Hz, 6 Hz, 8 Hz, and 10 Hz. These frequency conditions were coupled with two flow-rate conditions: 500 ml/min and 1,000 ml/min (Fig. 1*A*). When possible, two odors were used: K07 and ISO. The 243 trials recorded from 10 rats were included in the analyses.

Effects of sampling frequency and flow rate on the strength of the bulbar response: flow rate partially counterbalances the decrease in response strength caused by reduced inspiratory duration. The strength of the bulbar response was measured via three different signals in the anesthetized rats: LFP sampling-related modulation, LFP γ-oscillations, and unitary M/T cell activity.

LFP SAMPLING-RELATED MODULATION IN THE ANESTHETIZED PREPARATION. During spontaneous activity, the occurrence of LFP sampling-related modulation decreased significantly when the sampling frequency increased, whereas increased flow rate globally enhanced LFP occurrence (data not shown). During odor presentation, LFP sampling-related modulation was observed universally, with a markedly higher power in the sampling-related frequency band in the FFT. We analyzed the amplitude of LFP sampling-related modulation during odor presentation as a function of the imposed sampling frequency (Fig. 1). As the sampling frequency increased (Fig. 1, *B* and *D*), the amplitude of LFP sampling-related modulation decreased significantly [repeated-measures ANOVA, $n = 228$, $F(5,90) = 21.155$, $P < 0.0001$]. This decrease was probably the result of a decrease in the sampling volume (Fig. 1*A*) rather than the result of a possible uncoupling between bulbar activity and imposed sampling at high sampling frequencies. Indeed, as shown in Fig. 1*C*, regardless of the frequency, the cross-correlation coefficients did not vary significantly as a function of frequency, except in the 1-Hz condition [Fig. 1*C*; repeated-measures ANOVA, $n = 228$, $F(5,90) = 5.292$, $P < 0.001$; post hoc Student-Newman-Keuls test, $P < 0.05$]. In contrast, an increase in flow rate resulted in an increase in the amplitude of LFP sampling-related modulation [repeated-measures ANOVA, $n = 228$, $F(1,18) = 12.861$, $P < 0.01$; Fig. 1*B*]. Indeed, a post hoc test revealed a significant effect ($P < 0.05$) at the basal, 4 Hz, 8 Hz, and 10 Hz frequencies and a similar tendency at 6 Hz ($P = 0.087$). An increased flow rate slightly improved the cross-correlation coefficient [repeated measures ANOVA, $n = 228$, $F(1,18) = 6.703$, $P < 0.05$; Fig. 1*C*].

With the use of these data, we were able to compare the amplitude of LFP sampling-related modulation between two conditions; for example, we compared the LFP amplitude between the basal/500-ml/min condition and the 6-Hz/1,000-ml/min condition. Interestingly, the amplitude of LFP sampling-related modulation was similar in both conditions (*t*-test, $P > 0.05$). The same observation was obtained for the 4-Hz/500-ml/min and 8-Hz/1,000-ml/min conditions, which shows that a high flow rate can compensate for the effects of high sampling frequency.

Finally, LFP sampling-related modulation still persisted at high sampling frequencies and was at least partially enhanced by an increased flow rate.

LFP: γ-OSCILLATIONS IN THE ANESTHETIZED PREPARATION. With the use of our double-cannulated anesthetized preparation, we next assessed the effects of imposed sampling variations on LFP γ-oscillations. We first looked at the γ-occurrence during the entire period of odorant stimulation (the γ-occurrence was defined as the probability of observing a γ-burst, irrespective of the number of oscillatory bursts occurring during odorant stimulation). The γ-oscillation occurrence did not seem to be strongly affected by variations in the sampling frequency. Indeed, as shown in Fig. 2*A*, we only observed a slight decrease in the γ-oscillation in response to increased sampling frequency, and the only significant difference was between 1 Hz (occurrence = 68%) and 10 Hz [35%, $\chi^2(1) = 4.356$, $P < 0.05$]. In contrast, the occurrence of γ-oscillations was somewhat increased by an increased flow rate [$\chi^2(1) = 4.31$, $P < 0.05$]. There was no significant difference between the basal/500-ml/min and the 6-Hz/1,000-ml/min combinations or between the 4-Hz/500-ml/min and 8-Hz/1,000-ml/min combinations (χ^2 test, $P > 0.05$). Thus increased flow rate partly counterbalances the effect of high frequency, and this effect was most apparent at the highest sampling frequency. Although the global γ-occurrence was only slightly modified by the sampling frequency, we observed a change in the probability of γ-burst recurrence at each sampling cycle. Indeed, as Fig. 2, *B1* and *B2*, shows, the γ-recurrence decreased significantly when the sampling frequency increased [ANOVA, $F(5,137) = 27.505$, $P < 0.0001$]. Notably, the γ-recurrence was higher at 1 Hz than at all other frequencies and higher at the basal frequency than at 6 Hz, 8 Hz, or 10 Hz (post hoc Student-Newman-Keuls test, $P < 0.05$). This decrease in the γ-recurrence was not significantly compensated for an increased flow rate [ANOVA, $F(1,137) = 0.323$, $P = 0.57$]. Indeed, a comparison of the basal/500-ml/min with the 6-Hz/1,000-ml/min combination or the 4-Hz/500-ml/min with the 8-Hz/1,000-ml/min combination revealed that the γ-recurrence was significantly higher at the low sampling frequencies and was not counterbalanced by increased flow rate.

The decrease in γ-occurrence or recurrence was not caused by a detection bias, which could have been introduced by a decrease in the amplitude of γ-oscillations. Indeed, intrinsic γ-characteristics were affected little or not at all by the frequency and flow rate; neither γ-power [data not shown; ANOVA γ-power: frequency $F(5,137) = 0.801$, $P = 0.55$; flow rate $F(1,137) = 0.0001$, $P = 0.992$] nor γ-frequency [ANOVA γ-frequency: frequency $F(5,137) = 0.57$, $P = 0.72$; flow rate $F(1,137) = 0.7$, $P = 0.4$] was affected by the sampling frequency or flow rate. Only the γ-duration was affected by the sampling frequency; the duration of γ-bursts was significantly longer at 1 Hz than at basal frequency, 4 Hz, or 8 Hz [ANOVA γ-duration: frequency $F(5,137) = 3.970$, $P < 0.01$; flow rate $F(1,137) = 0.477$, $P = 0.49$, post hoc Student-Newman-Keuls test].

Finally, the occurrence of LFP γ-oscillations decreased when the sampling frequency increased, and a higher flow rate compensated for this effect to some extent. To gain further insight into the influence of sampling variations, we next looked at the OB unitary level.

UNITS IN THE ANESTHETIZED EXPERIMENTAL PREPARATION: SAMPLING-RELATED PATTERNS OF M/T CELLS PERSIST AT HIGH SAMPLING FREQUENCIES. In total, 18 M/T cells were recorded, with 29 neuron/odor pairs recorded from 10 rats. We measured the percentage of responding cells at each frequency and flow rate condition. Regardless of sampling variation, the responsive-

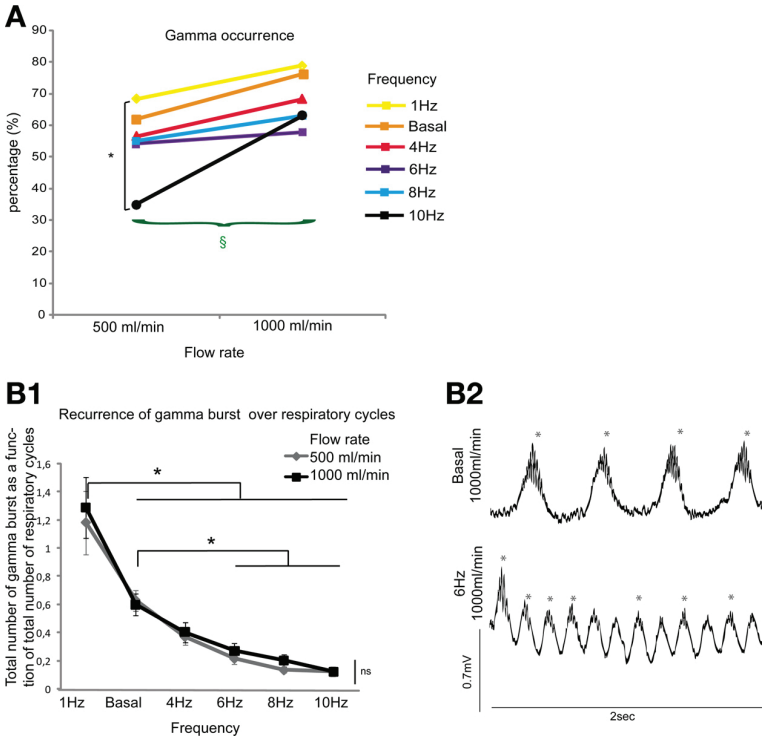


Fig. 2. γ-Oscillations still appear at high sampling frequencies, but their recurrence over sampling cycles decreases. The occurrence of γ-oscillations was only slightly affected by the sampling frequency, but it was more dependent on flow rate. *A*: a plot of the percentage of trials where γ-oscillations occurred as a function of the sampling frequency, and sampling flow rate is presented. Yellow, 1 Hz; orange, basal frequency; red, 4 Hz; violet, 6 Hz; blue, 8 Hz; and black, 10 Hz. Number of trials where γ-oscillations occurred at 500 ml/min: n = 13, 13, 13, 13, 11, and 7 for 1 Hz, basal frequency, 4 Hz, 6 Hz, 8 Hz, and 10 Hz, respectively. Number of trials at 1,000 ml/min: n = 15, 16, 13, 11, 12, and 12 for 1 Hz, basal frequency, 4 Hz, 6 Hz, 8 Hz, and 10 Hz, respectively. Statistical test: χ^2; §$P < 0.05$. The difference at 500 ml/min between the 10-Hz and 1-Hz sampling frequency conditions: *$P < 0.05$. *B1*: the recurrence of γ-bursts at each sampling cycle was affected by variations in the sampling frequency. Plot of the mean (±SE) number of γ-oscillatory bursts/total number of sampling cycles as a function of the sampling frequency and flow rate. Gray, 500 ml/min flow rate; black, 1,000 ml/min flow rate. Number of trials at 500 ml/min: n = 13, 13, 13, 13, 11, and 7 for 1 Hz, basal frequency, 4 Hz, 6 Hz, 8 Hz, and 10 Hz, respectively. Number of trials at 1,000 ml/min: n = 15, 16, 13, 11, 12, and 12 for 1 Hz, basal, 4 Hz, 6 Hz, 8 Hz, and 10 Hz, respectively. Statistical test: factorial ANOVA; *$P < 0.05$ (*top*), difference between 1 Hz and all other frequencies; *$P < 0.05$ (*bottom*), difference between basal and 6 Hz, 8 Hz, and 10 Hz. ns, Not significant. *B2*: examples of 2 raw data sets recorded from the same channel under basal and 6 Hz sampling frequency conditions (at a fixed flow rate of 1,000 ml/min). *Occurrence of γ-oscillations.

ness of M/T cells to odor was stable and ranged from 69% to 84% (data not shown). We observed a slight increase in cell responsiveness to odor when the flow rate was increased. It has been shown by others that M/T units in behaving rodents tend to lose their respiration-related patterning during rapid sampling (Bhalla and Bower 1997; Kay and Laurent 1999; Pager 1985; Rinberg et al. 2006a). Surprisingly, we observed that M/T cells still manifested a sampling-related pattern at high sampling frequencies (Fig. 3*B*), which confirms the recent results obtained by Carey and Wachowiak (2011). For example, under the 10-Hz and 1,000-ml/min conditions, we observed that 52.4% of cells exhibited sampling-related activity. By plotting M/T cell-spike discharges relative to the animal's respiratory cycle, we found that the rhythmicity of M/T cells was effectively linked to the imposed sampling and not to the animal's own respiration (data not shown). In addition to the strong persistence of the sampling-related rhythmicity of M/T cells, we observed that increased sampling frequency led to a progressive decrease in the percentage of cells exhibiting a SYNCHRO pattern from 83.3% in the basal condition to 33.3% in the 10-Hz condition (at 500 mL/min; Fig. 3*B*). Conversely, an increase in the flow rate (1,000 mL/min) improved these percentages [χ^2 (1) = 6.786, $P < 0.01$]. Indeed, at a high flow rate, >50% of the SYNCHRO patterns persisted, regardless of the sampling frequency (Fig. 3*B*). Moreover, there was no significant difference between the basal/500-ml/min and the 6-Hz/1,000-ml/min combinations or between the 4-Hz/500-ml/min and 8-Hz/1,000-ml/min combinations. Thus a higher flow rate partially counterbalanced the influence of a high sampling frequency.

We then quantified the phase of the M/T cell discharge according to the sampling cycle, which revealed a cell discharge phase-shift when the sampling frequency increased (Fig. 3*A*, all cells; Fig. 3*C*, single cell). This phase-shift was observed in all cells whose SYNCHRO activity persisted over a wide range of frequencies. The phase of the spikes respective to the imposed sampling cycle shifted later in the sampling cycle when the frequency increased. This phase-shift was also observed relative to the LFP sampling-related modulation (data not shown).

To summarize, when the sampling frequency increased, the probability of SYNCHRO patterns decreased, and this tendency could be counterbalanced by a higher flow rate. The sampling frequency also affected the phase of spike discharge relative to the imposed sampling cycle. Next, we asked whether the sampling variation also affects M/T cell response latency.

Effects of sampling frequency and flow rate on the latency of bulbar responses: increased flow rate but not increased sampling frequency decreases the M/T cell response latency. Wesson et al. (2009) showed that the olfactory receptor neurons onset latencies from high frequency sniffing trials were significantly shorter than those from low frequency trials. Can a shortening of latencies be similarly observed in the M/T cell response? To address this question, we needed to analyze an event with a precise latency. We thus focused our analysis on the latency of the first spike, which is a discrete event. Numerous authors have highlighted the importance of spike latency in odor coding (Cury and Uchida 2010; Junek et al. 2010). For this purpose, we measured the latency of the first spike relative to the beginning of the first inspiration after odor onset, as described by others (Cury and Uchida 2010; Wesson et al. 2009) (Fig. 4*A*). Because we were interested in a short-lived event, we restricted the analysis window to 1 s, as the minimum sampling frequency was 1 Hz. Surprisingly, we did not detect a significant effect of sampling frequency on first spike latency [Fig.

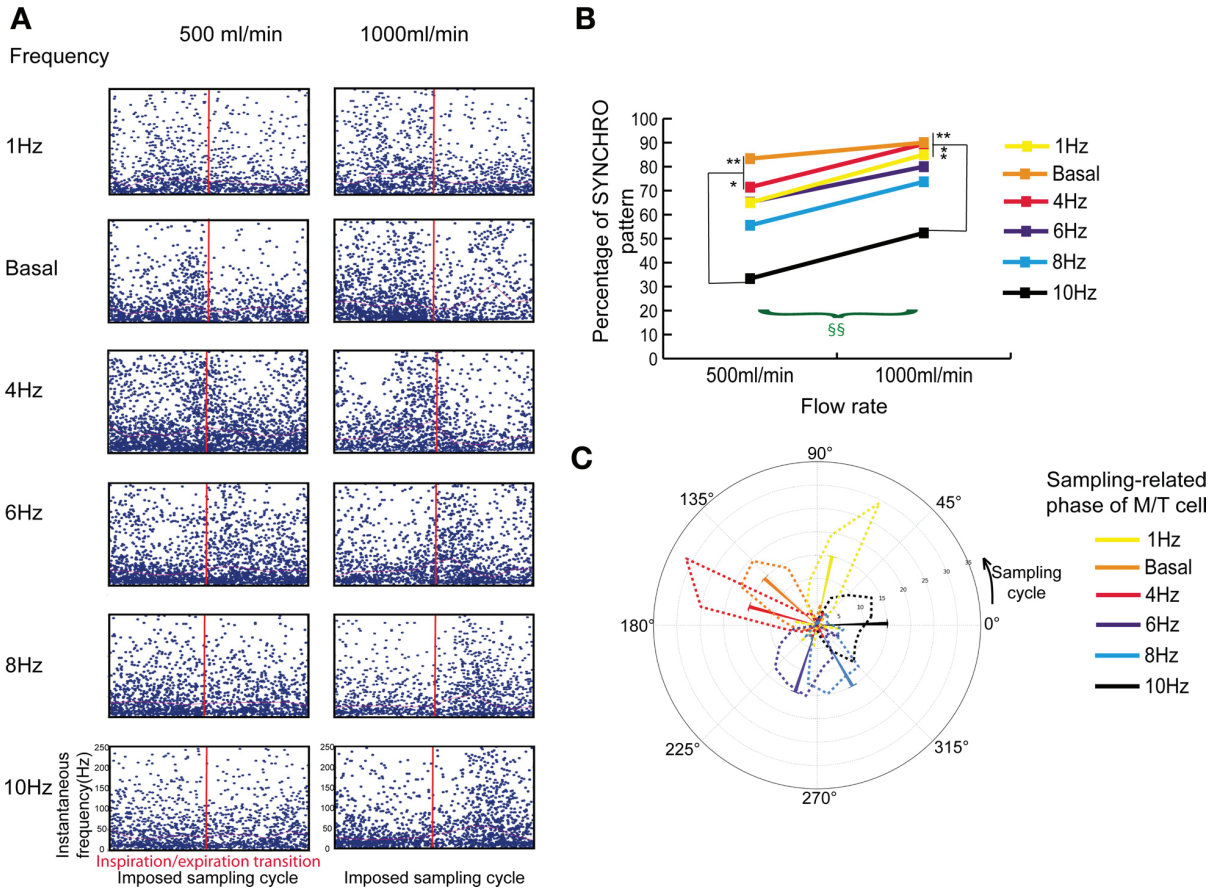


Fig. 3. Sampling patterns persist at high sampling frequencies. *A*: representation of the activities of the whole population of mitral/tufted (M/T) cells relative to the imposed sampling cycle. Dots represent 1/interspike interval of all units relative to their sampling phase. The sampling cycle is depicted between 0 and 1, where 0 represents the beginning of inspiration, and 0.5 represents the transition between inspiration/expiration (red bar). The pink line represents the 50th percentile. *B*: percentage of sampling-related M/T cell patterns as a function of the imposed sampling frequency and flow rate (yellow, 1 Hz; orange, basal frequency; red, 4 Hz; violet, 6 Hz; blue, 8 Hz; black, 10 Hz). Number of neuron/odor pairs at 500 ml/min: 20, 18, 21, 23, 18, and 18 for 1 Hz, basal frequency, 4 Hz, 6 Hz, 8 Hz, and 10 Hz, respectively. Number of neuron/odor pairs at 1,000 ml/min: 20, 20, 19, 20, 19, and 21 for 1 Hz, basal, 4 Hz, 6 Hz, 8 Hz, and 10 Hz, respectively. Statistical test: χ^2, §§global effect of flow rate ($P < 0.01$). Effect of frequency under 500 ml/min flow-rate condition: 10 Hz vs. Basal (**$P <$ 0.01), 10 Hz vs. 4 Hz (*$P < 0.05$). Under 1,000 ml/min condition: 10 Hz vs. Basal (**$p < 0.01$), 10 Hz vs. 4 Hz (*$P < 0.05$). SYNCHRO, Spiking discharge presented synchronized activity relative to the imposed sampling cycle. *C*: example of the cellular activity occurring during odor presentation showing a phase-shift of the spike discharge as a function of the sampling frequency. Flow rate: 500 ml/min for all frequencies. The circular diagram depicts a sampling cycle. The M/T cell spike discharge is presented relative to the sampling cycle. Examples of M/T cell discharges at 500 ml/min under the 6 sampling frequencies. Colors/frequencies are the same as in *B*. The dotted lines represent the total discharge of the cell under each sampling frequency. The solid lines represent the mean direction of the M/T cell spike discharge relative to the circular diagram.

4, *B1* and *B2*; ANOVA, $n = 229$, F (5,217) = 0.671, $P = 0.64$]. In contrast, an increase in the flow rate led to a significant shortening of first spike latency [Fig. 4, *B1* and *B2*; ANOVA, $n =$ 229, F (1,217) = 8.442, $P < 0.01$]. The mean of the first spike latency shifted from 179 ms to 119 ms when the flow rate was increased from 500 to 1,000 ml/min (Fig. 4*B2*). These results show that a higher flow rate, but not a higher sampling frequency, decreased the latency of the bulbar response.

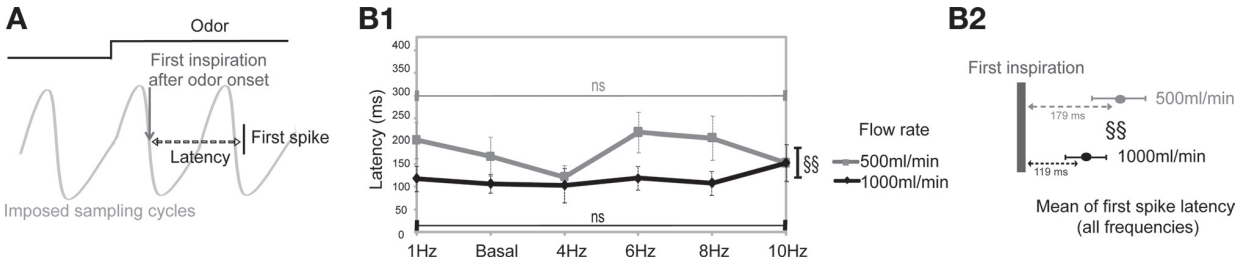


Fig. 4. Sampling stronger but not sampling faster decreases the olfactory bulb (OB) response. *A*: first spike latency is defined as the first spike following the first inspiration after odor onset. *B1*: mean (SE) first spike latencies are presented as a function of sampling frequency and flow rate (gray, 500 ml/min; black, 1,000 ml/min). Statistical test: factorial ANOVA, §§$P < 0.01$. *B2*: mean first spike latency (all frequencies averaged) for flow rates of 500 ml/min (gray) and 1,000 ml/min (black); ANOVA, §§$P < 0.01$.

To determine the joint effects of sniffing frequency and flow rate, we next looked at how these two parameters evolve in behaving animals and how they change relative to one another.

Experiment 2: Relationship Between Sniffing Frequency and Flow Rate in Behaving Animals

To precisely analyze the sniffing behavior of freely moving rats, we used a whole-body plethysmograph. Analyses were performed on six rats. Sniffing behavior was well described by Welker (1964) and then by Youngentob et al. (1987). Our aim here was not to describe the different sniffing characteristics, as Walker et al. (1997) did previously; rather, our goal was to analyze the relationship between the frequency and flow rate. First, as described by others (Cury and Uchida 2010; Wesson et al. 2008a), we observed that the distribution of sniffing frequencies was bimodal (Fig. 5, *A* and *B*) and reflected the prevalence of two respiration modes: a low frequency mode (1–3 Hz) and a high frequency mode (6–10 Hz). To determine whether the frequencies and flow rates covaried, we looked for correlations between the instantaneous sniffing frequency and the peak flow rates during both expiration and inspiration phases. We observed that the sniffing frequency and peak flow rate varied in parallel. Indeed, the correlation between the sniffing frequency and expiration peak flow rate was significant ($r = 0.446$, $P < 0.0001$, $n = 41{,}717$). Similarly, the correlation between the sniffing frequency and inspiration peak flow rate was highly significant ($r = 0.515$, $P < 0.0001$, $n = 41{,}717$). The same observations were obtained when the durations of inspiration and expiration were analyzed as a function of peak flow rate. As the duration decreased (i.e., sniffing frequency increased), the peak flow rate increased (for the expiration phase, $r = -0.461$, $P < 0.0001$; for the inspiration phase, $r = -0.564$, $P < 0.0001$, $n = 41{,}717$; the inspiration and expiration durations were examined independently). Thus the sniffing frequency and flow rate can covary in freely moving animals. To compare these data with our electrophysiological data, we merged all of the individual frequencies into six classes corresponding to the six sampling frequencies imposed in our anesthetized preparation (±0.1 Hz): 1 Hz, 2 Hz, 4 Hz, 6 Hz, 8 Hz, and 10 Hz. The results are presented in Fig. 5, *C1* and *C2*. The data confirm that an increase in sniffing frequency was associated with a significant increase in both expiratory peak flow rate [Fig. 5*C1*; ANOVA, $F(5,4,051) = 191.974$, $P < 0.0001$; post hoc Student-Newman-Keuls test, $P < 0.05$] and inspiratory flow rate [Fig. 5*C2*; ANOVA, $F(5,4,051) = 314.645$, $P < 0.0001$]. The inspiratory peak flow rate was different between each sniffing frequency, except between 6 Hz and 8 Hz (post hoc Student-Newman-Keuls test, $P < 0.05$). Volume is an important element affected by sniffing flow rate and frequency. We asked whether an increase in flow rate could maintain constancy for volume. As shown in Fig. 5, *D1* and *D2*, as the sniffing frequency increased, the volume significantly decreased during both the expiration [Fig. 5*D1*; ANOVA, $F(5,4,051) = 273.75$, $P < 0.0001$; post hoc Student-Newman-Keuls test, $P < 0.05$] and the inspiration [Fig. 5*D2*; ANOVA, $F(5,4,051) = 311.843$, $P < 0.0001$] phase. Overall, our results show that when the sniffing frequency increases, there is a concomitant increase in flow rate in the behaving animal. This tradeoff does not allow the sniffing volume to remain constant. We finally asked whether the persistence of LFP sampling-related modulation could be an effect of anesthesia resulting from the imbalance between the peripheral and central influences.

Experiment 3: LFP Sampling-Related Modulation Persists at a High Sampling Frequency in the Awake Experimental Preparation

We recorded LFP in the OB and sniffing activity in two awake rats (Fig. 6*A*). LFP activity in the OB of awake rats has been well described by numerous authors (Freeman 1978; Kay 2005; Martin et al. 2004). Although these authors described a θ-rhythm (4–12 Hz) in the OB, none concomitantly recorded the sniffing behavior. We observed that sampling-related modulation was still present in the LFP signal regardless of the animal's sampling frequency (Fig. 6, *B1* and *B2*). LFP sampling-related modulation and animal respiration were tightly related, and the TFRs of both signals were superimposable (Fig. 6, *B1* and *B2*). Interestingly, abrupt variations in the sniffing frequency were strictly reflected by the LFP activity. Therefore, even in a preparation where central control was not depressed, the LFP signals accurately followed the sniffing modulation up to frequencies as high as 10 Hz, as shown in Fig. 6*B2*.

Overall, the results show that LFP sampling-related modulation persists at high sampling frequencies in anesthetized and awake rats.

DISCUSSION

Sampling is not only a simple vector for odor molecules but also plays a role in olfactory processing (Mainland and Sobel 2006). Sampling can vary in frequency and flow rate (Youngentob et al. 1987), and the question of how sampling variations affect the activity of the olfactory system is a subject of growing interest. In this study, we asked two major questions: what are the effects of high sampling frequency on OB activity at the levels of M/T cell and network activities? Can sampling flow rate compensate for these effects? We observed a tradeoff effect between sampling frequency and flow rate on some bulbar activity features. This tradeoff allows OB activity to maintain a sampling-related rhythmicity and induces faster odor-evoked responses, and it is used effectively in awake animals, in which we observed that frequency and flow rate often co-increase. To our knowledge, our study is the first to report that the sampling frequency and flow rate can act either independently or synergistically on bulbar output to shape the neuronal message.

Sampling-Related Activity is Maintained at High Sampling Frequencies

We observed that OB sampling-related modulation persisted at high sampling frequencies, although it was weakened (Figs. 1–3). This finding is in agreement with previous studies on olfactory epithelium (Ezeh et al. 1995; Ghatpande and Reisert 2011), glomerular (Spors et al. 2006), and M/T cell activity (Bhalla and Bower 1997; Carey and Wachowiak 2011). The effects of high sampling frequency are probably the result of a decrease in the duration of inspiration, which in turn, results in decreased activation of the olfactory epithelium. If this is true, then we can hypothesize that an increased flow rate would compensate for this effect. We observed that increased flow rate compensated, to some extent, for the effects of high sampling frequency by enhancing LFP sampling-related mod-

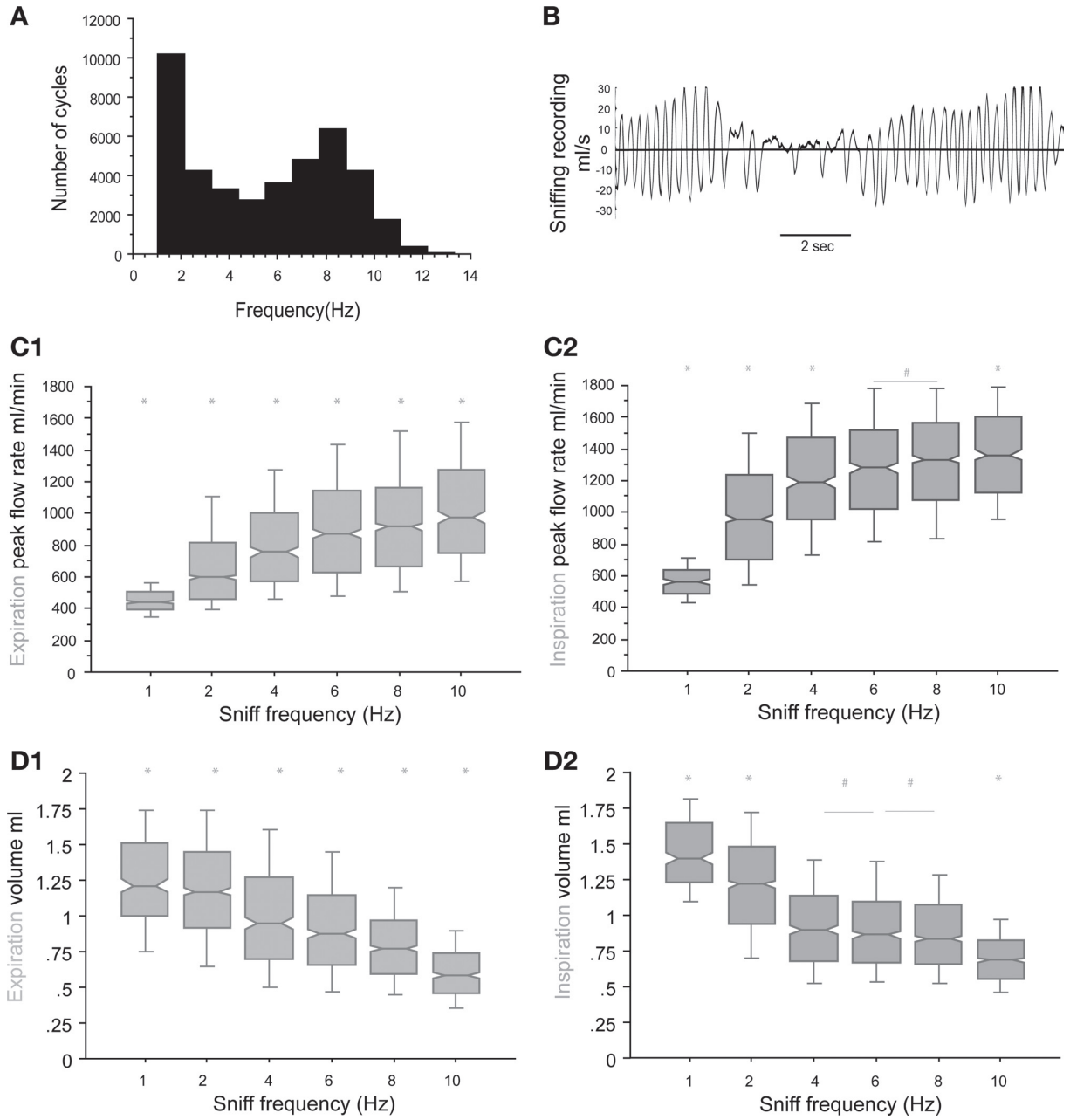


Fig. 5. Sniffing frequency and flow rate significantly covary in freely moving rats. *A*: distribution of the sniffing frequencies. Note the bimodal nature of the distribution. *B*: example of the raw sniffing frequency data recorded by plethysmograph. The horizontal black bar corresponds to the point of null airflow in the rising phase; the negative and positive phases correspond to inspiration and expiration, respectively. We note that sniffing behavior shifts quickly from a low to high frequency mode and vice versa. *C*: box plot representing expiratory (*C1*) and inspiratory (*C2*) peak flow rates as a function of the sniffing frequency range ($\pm$0.1). For both the expiratory and inspiratory phases, n = 266, 1,083, 503, 649, 981, and 575 for 1 Hz, 2 Hz, 4 Hz, 6 Hz, 8 Hz, and 10 Hz, respectively. Statistical test: factorial ANOVA with post hoc Student-Newman-Keuls test; *$P < 0.05$. The inspiratory flow rates at 6 Hz and 8 Hz were not significantly different, but both were different from the flow rates at 1 Hz, 2 Hz, 4 Hz, and 10 Hz; #$P < 0.05$. *D*: box plot representing the expiratory (*D1*) and inspiratory (*D2*) volumes as a function of the sniffing frequency range ($\pm$0.1). For both the expiratory and inspiratory phases, n = 266, 1,083, 503, 649, 981, and 575 for 1 Hz, 2 Hz, 4 Hz, 6 Hz, 8 Hz, and 10 Hz, respectively. Statistical test: factorial ANOVA with post hoc Student-Newman-Keuls test; *$P < 0.05$. The inspiratory flow rate under the 4 Hz and 6 Hz conditions and the 6 Hz and 8 Hz conditions were not significantly different, but both were different from the flow rates at the other frequencies; #$P < 0.05$.

ulation, γ-occurrence, and synchronized patterns in M/T cells. The only partial compensation of flow rate for the effects of increased frequency is probably because of the loss of volume at higher sniffing frequency (Fig. 1*A*). Regardless, the increased flow rate allows the OB activity to maintain a sampling-related rhythmicity at high sampling frequencies. This finding was obtained in both the anesthetized and awake preparation (Figs. 5 and 6), and this persistence is likely to be important in terms of inter-area communication (for review, see Kepecs et al. 2006). Indeed, the sampling rhythm is in the

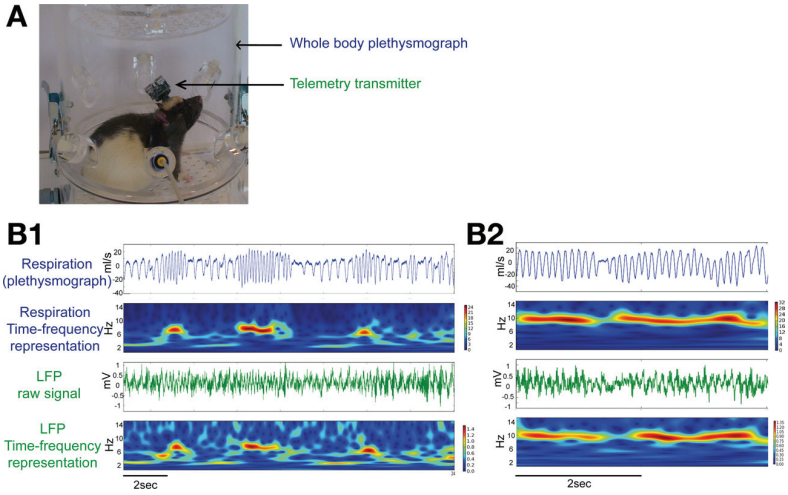


Fig. 6. LFP and sniffing recordings in awake rats. *A*: picture of a rat in the plethysmograph chamber with a telemetry emitter. *B1*: example of a sniffing recording and an OB LFP recording in 1 rat. From top to bottom: sniffing signals measured by the plethysmograph (emka Technologies); a representation of this raw signal on a time-frequency map; raw data showing LFP bulbar activity; and the associated time-frequency representation (TFR). In the TFRs, amplitudes are color-coded in arbitrary units. *B2*: same as *B1*; an example of a recording in the other rat with a sniffing frequency of up to 10 Hz.

θ-band (4–12 Hz), and θ-rhythms have been described in systems closely related to or involved in olfactory processing, such as the whiskers (Sobolewski et al. 2011) and the limbic system (Bland 1986; Buzsáki 2002; Komisaruk 1970; Macrides et al. 1982; Vanderwolf 1969). Moreover, the coherence between OB and hippocampal θ-oscillations has been found to be significant only during odor sampling (Kay 2005). Interestingly, the cerebellum, which is activated by sniffing (Sobel et al. 1998) and has been implicated in breathing control (Colebatch et al. 1991), has been shown to express θ-rhythms (Wikgren et al. 2010). θ-Rhythms could thus permit the transmission of olfactory information among the olfactory, limbic, and cerebellar structures and could thus be the basis for the rapid feedback of the olfactory system on sampling control (Johnson et al. 2003). In this view, the maintenance of a sampling-related rhythm represents a key mechanism.

Increased Sampling Flow Rate But Not Increased Sampling Frequency Shortens the OB Response Latency

Multiple psychophysical studies have noted the speed of olfactory discrimination in rodents (Abraham et al. 2004; Rinberg et al. 2006b; Uchida and Mainen 2003), which indicates rapid olfactory processing. We could think that a high sampling frequency would reduce the latency of the bulbar response. Although Wesson et al. (2009) showed that this holds true for neuroreceptor responses in awake animals, we observed that a high sampling frequency did not significantly impact the latency of the M/T cell response. Our observation is in agreement with the studies by Carey and Wachowiak (2011) and Spors et al. (2006). More interestingly, we observed that the M/T cell response latency can be reduced by increasing the flow rate. Whereas other authors have shown that increasing odor concentration decreases the M/T cell-firing latency (Cang and Isaacson 2003; Wellis et al. 1989), this is the first evidence to show that a sampling parameter alone (i.e., flow rate) can impact the M/T cell response latency. This result may reconcile the data of Wesson et al. (2009) with ours, because they did not specify whether a high sampling frequency was associated with an increase in flow rate in their preparation. Because discrimination can be achieved in $<$500 ms (Abraham et al. 2004; Rinberg et al. 2006b; Uchida and Mainen 2003), the olfactory system must operate on a rapid timescale to provide a quick response. We demonstrated that it is possible to shorten the OB response latency by increasing the sampling flow rate.

We observed a minimal and constant OB response latency regardless of the sampling frequency. Multiple arguments, which are not mutually exclusive, can be proposed to explain this latency. First, there is an incompressible time period that corresponds to information transduction in the olfactory epithelium and/or conduction to the OB (Grosmaitre et al. 2006; Kleene 2008). Second, the shortness of inspiration at a high sampling frequency might need to be compensated for by the cumulative effect of several cycles of olfactory epithelium activation. Furthermore, this constant latency is probably related to the observed phase-shift in the synchronized pattern relative to the imposed sampling cycle. Because odor onset and odor response latency were fixed, whereas the sampling frequency increased, the first M/T cell spike was shifted relative to the imposed sampling cycle. This is a possible explanation, and it does not exclude the alternatives, such as a differential odorant deposition, as a function of sampling frequency (Jiang and Zhao 2010). This observed shift could also be the result of a modulation of granular inhibition induced by stimulus frequency (Young and Wilson 1999) or excitatory centrifugal input (Balu et al. 2007). A phase-shift of M/T cell discharge could have important consequences for downstream area reading, for example, by changing the respiratory phase of piriform cortex cells (Litaudon et al. 2003; Wilson 1998). The phase-shift of the M/T cell discharge could encode a stimulus parameter, such as a change in sampling frequency or a change in stimulus concentration because of the reduced inspiration time (Kepecs et al. 2006).

Different Sniffing Strategies Right Under The Nose

The last part of our results (Fig. 5) shows a co-increase between the sampling frequency and flow rate with a correlation of up to 0.5. This result also means that other strategies could exist, such as combinations of low flow rate/high sampling frequency or high flow rate/low frequency. Moreover, previous studies have shown that sniffing varies depending on the task (Kepecs et al. 2007; Wesson et al. 2008b; Youngentob et al. 1987). Thus an animal has the ability to combine various sniffing parameters differently according to the task and/or environment, which likely confers an important degree of adaptability to the olfactory system. As

suggested by Schoenfeld and Cleland (2005, 2006), sampling can improve olfactory capabilities by allowing the optimization of the deposition of odor molecules through the olfactory epithelium. Further studies using behaving animals will be required to gain insight into how the olfactory system can control sniffing and to provide evidence for an olfactory motor act.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Corine Amat, Virginie Briffaud, Frederic Esclassan, and Anne Marie Mouly for their helpful comments on the manuscript. We thank Marc Thévenet, Belkacem Messaoudi, and Vincent Farget for technical assistance.

GRANTS

This work was supported by a grant from "Agence Nationale de la Recherche" (#ANR-07-NEURO-030).

DISCLOSURES

No conflicts of interest, financial or otherwise, are declared by the author(s).

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Author contributions: E. C., P. L., S. G., and N. B. conception and design of research; E. C. and C. H. performed experiments; E. C., N. F- T., and N. B. analyzed data; E. C. and N. B. interpreted results of experiments; E. C. prepared figures; E. C. and N. B. drafted manuscript; E. C., C. H., P. L., N. F-T., and N. B. edited and revised manuscript; E. C., C. H., P. L., S. G., N. F-T., and N. B. approved final version of manuscript.

REFERENCES

Abraham NM, Spors H, Carleton A, Margrie TW, Kuner T, Schaefer AT. Maintaining accuracy at the expense of speed: stimulus similarity defines odor discrimination time in mice. *Neuron* 44: 865–876, 2004.

Adrian ED. Olfactory reactions in the brain of the hedgehog. *J Physiol* 100: 459–473, 1942.

Balu R, Pressler RT, Strowbridge BW. Multiple modes of synaptic excitation of olfactory bulb granule cells. *J Neurosci* 27: 5621–5632, 2007.

Bhalla US, Bower JM. Multiday recordings from olfactory bulb neurons in awake freely moving rats: spatially and temporally organized variability in odorant response properties. *J Comput Neurosci* 4: 221–256, 1997.

Bland BH. The physiology and pharmacology of hippocampal formation theta rhythms. *Prog Neurobiol* 26: 1–54, 1986.

Buonviso N, Amat C, Litaudon P, Roux S, Royet JP, Farget V, Sicard G. Rhythm sequence through the olfactory bulb layers during the time window of a respiratory cycle. *Eur J Neurosci* 17: 1811–1819, 2003.

Buonviso N, Chaput MA. 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: 447–454, 1990.

Buonviso N, Chaput MA, Berthommier F. Temporal pattern analyses in pairs of neighboring mitral cells. *J Neurophysiol* 68: 417–424, 1992.

Buzsáki G. Theta oscillations in the hippocampus. *Neuron* 33: 325–340, 2002.

Cang J, Isaacson JS. In vivo whole-cell recording of odor-evoked synaptic transmission in the rat olfactory bulb. *J Neurosci* 23: 4108–4116, 2003.

Carey RM, Verhagen JV, Wesson DW, Pírez N, Wachowiak M. Temporal structure of receptor neuron input to the olfactory bulb imaged in behaving rats. *J Neurophysiol* 101: 1073–1088, 2009.

Carey RM, Wachowiak M. Effect of sniffing on the temporal structure of mitral/tufted cell output from the olfactory bulb. *J Neurosci* 31: 10615–10626, 2011.

Cenier T, David F, Litaudon P, Garcia S, Amat C, Buonviso N. Respiration-gated formation of gamma and beta neural assemblies in the mammalian olfactory bulb. *Eur J Neurosci* 29: 921–930, 2009.

Chaput MA. EOG responses in anesthetized freely breathing rats. *Chem Senses* 25: 695–701, 2000.

Chaput MA, Buonviso N, Berthommier F. Temporal patterns in spontaneous and odour-evoked mitral cell discharges recorded in anaesthetized freely breathing animals. *Eur J Neurosci* 4: 813–822, 1992.

Colebatch JG, Adams L, Murphy K, Martin AJ, Lammertsma AA, Tochon-Danguy HJ, Clark JC, Friston KJ, Guz A. Regional cerebral blood flow during volitional breathing in man. *J Physiol* 443: 91–103, 1991.

Courtiol E, Amat C, Thévenet M, Messaoudi B, Garcia S, Buonviso N. Reshaping of bulbar odor response by nasal flow rate in the rat. *PLoS One* 6: e16445, 2011.

Cury KM, Uchida N. Robust odor coding via inhalation-coupled transient activity in the mammalian olfactory bulb. *Neuron* 68: 570–585, 2010.

Ezeh PI, Davis LM, Scott JW. Regional distribution of rat electroolfactogram. *J Neurophysiol* 73: 2207–2220, 1995.

Freeman WJ. Spatial properties of an EEG event in the olfactory bulb and cortex. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 44: 586–605, 1978.

Garcia S, Fourcaud-Trocmé N. OpenElectrophy: an electrophysiological data- and analysis-sharing framework. *Front Neuroinform* 3: 14, 2009.

Ghatpande AS, Reisert J. Olfactory receptor neuron responses coding for rapid odor sampling. *J Physiol* 589: 2261–2273, 2011.

Grosmaitre X, Vassalli A, Mombaerts P, Shepherd GM, Ma M. Odorant responses of olfactory sensory neurons expressing the odorant receptor MOR23: a patch clamp analysis in gene-targeted mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 103: 1970–1975, 2006.

Hegoburu C, Shionoya K, Garcia S, Messaoudi B, Thévenet M, Mouly AM. The RUB cage: respiration-ultrasonic vocalizations-behavior acquisition setup for assessing emotional memory in rats. *Front Behav Neurosci* 5: 25, 2011.

Jiang J, Zhao K. Airflow and nanoparticle deposition in rat nose under various breathing and sniffing conditions: a computational evaluation of the unsteady effect. *J Aerosol Sci* 41: 1030–1043, 2010.

Johnson BN, Mainland JD, Sobel N. Rapid olfactory processing implicates subcortical control of an olfactomotor system. *J Neurophysiol* 90: 1084–1094, 2003.

Junek S, Kludt E, Wolf F, Schild D. Olfactory coding with patterns of response latencies. *Neuron* 67: 872–884, 2010.

Kay LM. Theta oscillations and sensorimotor performance. *Proc Natl Acad Sci USA* 102: 3863–3868, 2005.

Kay LM, Laurent G. Odor- and context-dependent modulation of mitral cell activity in behaving rats. *Nat Neurosci* 2: 1003–1009, 1999.

Kent PF, Mozell MM, Murphy SJ, Hornung DE. The interaction of imposed and inherent olfactory mucosal activity patterns and their composite representation in a mammalian species using voltage-sensitive dyes. *J Neurosci* 16: 345–353, 1996.

Kepecs A, Uchida N, Mainen ZF. Rapid and precise control of sniffing during olfactory discrimination in rats. *J Neurophysiol* 98: 205–213, 2007.

Kepecs A, Uchida N, Mainen ZF. The sniff as a unit of olfactory processing. *Chem Senses* 31: 167–179, 2006.

Kleene SJ. The electrochemical basis of odor transduction in vertebrate olfactory cilia. *Chem Senses* 33: 839–859, 2008.

Komisaruk BR. Synchrony between limbic system theta activity and rhythmical behavior in rats. *J Comp Physiol Psychol* 70: 482–492, 1970.

Litaudon P, Amat C, Bertrand B, Vigouroux M, Buonviso N. Piriform cortex functional heterogeneity revealed by cellular responses to odours. *Eur J Neurosci* 17: 2457–2461, 2003.

Macrides F, Chorover SL. Olfactory bulb units: activity correlated with inhalation cycles and odor quality. *Science* 175: 84–87, 1972.

Macrides F, Eichenbaum HB, Forbes WB. Temporal relationship between sniffing and the limbic theta rhythm during odor discrimination reversal learning. *J Neurosci* 2: 1705–1717, 1982.

Mainland J, Sobel N. The sniff is part of the olfactory percept. *Chem Senses* 31: 181–196, 2006.

Margrie TW, Schaefer AT. Theta oscillation coupled spike latencies yield computational vigour in a mammalian sensory system. *J Physiol* 546: 363–374, 2003.

Martin C, Gervais R, Hugues E, Messaoudi B, Ravel N. Learning modulation of odor-induced oscillatory responses in the rat olfactory bulb: a correlate of odor recognition?. *J Neurosci* 24: 389–397, 2004.

Mozell MM. Evidence for a chromatographic model of olfaction. *J Gen Physiol* 56: 46–63, 1970.

Oka Y, Takai Y, Touhara K. Nasal airflow rate affects the sensitivity and pattern of glomerular odorant responses in the mouse olfactory bulb. *J Neurosci* 29: 12070–12078, 2009.

Onoda N, Mori K. Depth distribution of temporal firing patterns in olfactory bulb related to air-intake cycles. *J Neurophysiol* 44: 29–39, 1980.

Pager J. Respiration and olfactory bulb unit activity in the unrestrained rat: statements and reappraisals. *Behav Brain Res* 16: 81–94, 1985.

Poo C, Isaacson JS. Odor representations in olfactory cortex: "sparse" coding, global inhibition, and oscillations. *Neuron* 62: 850–861, 2009.

Rinberg D, Koulakov A, Gelperin A. Sparse odor coding in awake behaving mice. *J Neurosci* 26: 8857–8865, 2006a.

Rinberg D, Koulakov A, Gelperin A. Speed-accuracy tradeoff in olfaction. *Neuron* 51: 351–358, 2006b.

Roux SG, Cenier T, Garcia S, Litaudon P, Buonviso N. A wavelet-based method for local phase extraction from a multi-frequency oscillatory signal. *J Neurosci Methods* 160: 135–143, 2007.

Roux SG, Garcia S, Bertrand B, Cenier T, Vigouroux M, Buonviso N, Litaudon P. Respiratory cycle as time basis: an improved method for averaging olfactory neural events. *J Neurosci Methods* 152: 173–178, 2006.

Schoenfeld TA, Cleland TA. Anatomical contributions to odorant sampling and representation in rodents: zoning in on sniffing behavior. *Chem Senses* 31: 131–144, 2006.

Schoenfeld TA, Cleland TA. The anatomical logic of smell. *Trends Neurosci* 28: 620–627, 2005.

Scott-Johnson PE, Blakley D, Scott JW. Effects of air flow on rat electroolfactogram. *Chem Senses* 25: 761–768, 2000.

Sobel EC, Tank DW. Timing of odor stimulation does not alter patterning of olfactory bulb unit activity in freely breathing rats. *J Neurophysiol* 69: 1331–1337, 1993.

Sobel N, Prabhakaran V, Desmond JE, Glover GH, Goode RL, Sullivan EV, Gabrieli JDE. Sniffing and smelling: separate subsystems in the human olfactory cortex. *Nature* 392: 282–284, 1998.

Sobolewski A, Swiejkowski DA, Wróbel A, Kublik E. The 5–12 Hz oscillations in the barrel cortex of awake rats—sustained attention during behavioral idling? *Clin Neurophysiol* 122: 483–489, 2011.

Spors H, Grinvald A. Spatio-temporal dynamics of odor representations in the mammalian olfactory bulb. *Neuron* 34: 301–315, 2002.

Spors H, Wachowiak M, Cohen LB, Friedrich RW. Temporal dynamics and latency patterns of receptor neuron input to the olfactory bulb. *J Neurosci* 26: 1247–1259, 2006.

Uchida N, Mainen ZF. Speed and accuracy of olfactory discrimination in the rat. *Nat Neurosci* 6: 1224–1229, 2003.

Vanderwolf CH. Hippocampal electrical activity and voluntary movement in the rat. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 26: 407–418, 1969.

Verhagen JV, Wesson DW, Netoff TI, White JA, Wachowiak M. Sniffing controls an adaptive filter of sensory input to the olfactory bulb. *Nat Neurosci* 10: 631–639, 2007.

Walker JK, Lawson BL, Jennings DB. Breath timing, volume and drive to breathe in conscious rats: comparative aspects. *Respir Physiol* 107: 241–250, 1997.

Welker WI. Analysis of sniffing of the albino rat. *Behaviour* 22: 223–244, 1964.

Wellis DP, Scott JW, Harrison TA. Discrimination among odorants by single neurons of the rat olfactory bulb. *J Neurophysiol* 61: 1161–1177, 1989.

Wesson DW, Carey RM, Verhagen JV, Wachowiak M. Rapid encoding and perception of novel odors in the rat. *PLoS Biol* 6: e82, 2008a.

Wesson DW, Donahou TN, Johnson MO, Wachowiak M. Sniffing behavior of mice during performance in odor-guided tasks. *Chem Senses* 33: 581–596, 2008b.

Wesson DW, Verhagen JV, Wachowiak M. Why sniff fast? The relationship between sniff frequency, odor discrimination, and receptor neuron activation in the rat. *J Neurophysiol* 101: 1089–1102, 2009.

Wikgren J, Nokia MS, Penttonen M. Hippocampo-cerebellar theta band phase synchrony in rabbits. *Neuroscience* 165: 1538–1545, 2010.

Wilson DA. Habituation of odor responses in the rat anterior piriform cortex. *J Neurophysiol* 79: 1425–1440, 1998.

Young TA, Wilson DA. Frequency-dependent modulation of inhibition in the rat olfactory bulb. *Neurosci Lett* 276: 65–67, 1999.

Youngentob SL, Mozell MM, Sheehe PR, Hornung DE. A quantitative analysis of sniffing strategies in rats performing odor detection tasks. *Physiol Behav* 41: 59–69, 1987.

Volume 106, December 2011

Courtiol et al. Individual and synergistic effects of sniffing frequency and flow rate on olfactory bulb activity. *J Neurophysiol* 106: 2813–2824, 2011; doi:10.1152/jn.00672.2011; http://jn.physiology.org/content/106/6/2813.full.

We now substitute the original incorrect Fig. 1 with the correct figure. The legend remains the same as originally published. The results and conclusions of this study stand.

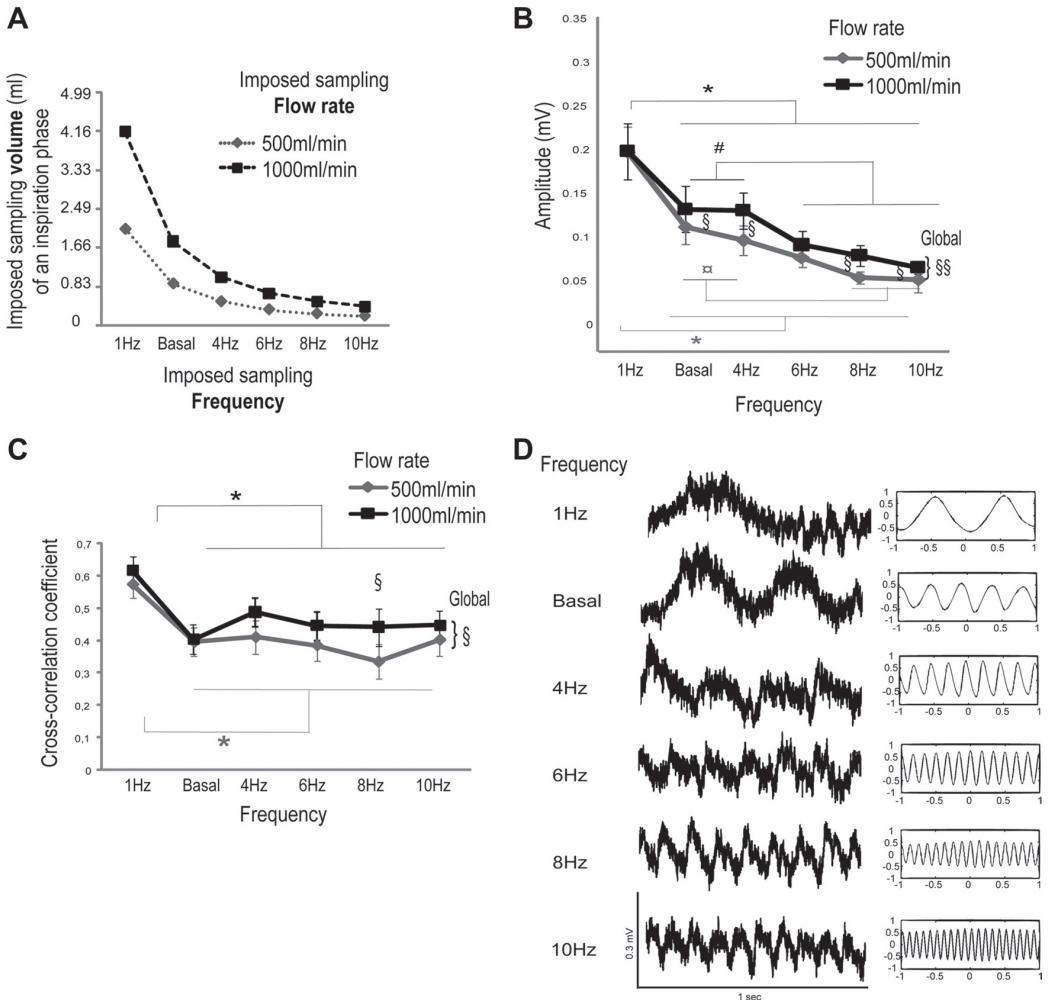


Fig. 1. Although attenuated, the local field potential (LFP) sampling-related rhythm persists at high sampling frequencies. *A*: imposed sampling conditions. Plots of the imposed sampling volumes of an inspiration as a function of the imposed frequency and flow rate. Six different nasal airflow frequencies of 1 Hz, basal frequency (which is the respiratory frequency of a urethane-anesthetized rat; mean = 2.3 Hz), 4 Hz, 6 Hz, 8 Hz, and 10 Hz and 2 nasal flow rates of 500 ml/min and 1,000 ml/min were imposed in a randomized procedure. *B*: plots of the mean amplitude of the LFP sampling-related modulation (±SE) as a function of the imposed frequency and flow rate. Gray, 500 ml/min flow rate; black, 1,000 ml/min flow rate. The number of trials for each flow rate and for each frequency was 19 (total = 228). Statistical analyses were performed using the repeated-measures ANOVA test, which revealed a global effect of the frequency; $P < 0.0001$. According to the Newman-Keuls post hoc test: *significant difference between 1 Hz and all other frequencies; #at 1,000 ml/min, there was no difference between basal and 4 Hz, but both were significantly different from 6 Hz, 8 Hz, and 10 Hz; ¤at 500 ml/min, there was no significant difference between basal and 4 Hz, but both were significantly different from 8 Hz and 10 Hz; §§global ANOVA effect of flow rate ($P < 0.01$). A post hoc Newman-Keuls test revealed a significant effect of the flow rate at basal, 4 Hz, 8 Hz, and 10 Hz (§) frequencies. *C*: mean cross-correlation coefficients (±SE) as a function of the imposed frequency and flow rate. The cross-correlation was assessed between the LFP sampling-related modulation and the imposed nasal airflow. Gray, 500 ml/min flow rate; black, 1,000 ml/min flow rate. The number of trials for each frequency and for each flow rate was 19. Statistical analyses were performed using repeated-measures ANOVA. The ANOVA revealed a global effect of frequency ($P < 0.001$). *significant difference between 1 Hz and all other frequencies when the Newman post hoc test was applied (*bottom*); § (*top*) global ANOVA effect of flow rate ($P < 0.05$). A post hoc Newman-Keuls test revealed a significant effect of the flow rate at 8 Hz (§ for both flow rate conditions). *D*, *left*: examples of raw data for the LFP recorded from the same channel under 6 different sampling frequencies at a flow rate of 1,000 ml/min. Note the decrease in the slow LFP modulation amplitude and its persistence across the frequencies. Cross-correlograms from the cross-correlation between the imposed sampling signals at 1,000 ml/min are presented on the *right*, and the corresponding raw data are on the *left*.

0022-3077/12 Copyright © 2012 the American Physiological Society

3.4 Modulation de la dynamique respiratoire en fonction de la qualité des molécules odorantes (étude 3)

3.4.1 Contexte et résumé

Différents auteurs ont considéré le flairage (ou respiration) non seulement comme le vecteur des molécules odorantes, mais aussi comme faisant parti du percept olfactif (Mainland et Sobel, 2006). La respiration contraint à la fois le décours temporel et l'intensité de l'input olfactif. Or la respiration est un acte extrêmement dynamique, elle peut varier aussi bien en fréquence qu'en amplitude (Youngentob *et al.*, 1987). Nous avons montré que ces variations avaient un impact sur l'activité du bulbe olfactif (études 1 et 2). Au niveau comportemental, néanmoins, le rôle précis des variations de flairage dans la perception olfactive demeure mal connu voire inconnu. Plusieurs questions restent non résolues. Notamment, est ce que les animaux adaptent leur façon de flairer une odeur en fonction de son intensité et/ou de sa qualité ? Si oui, est-ce que ces variations permettent d'améliorer la perception olfactive ? En terme d'intensité, il a été démontré à la fois chez l'Homme (Johnson *et al.*, 2003) et chez le rat (Youngentob *et al.*, 1987) que l'amplitude de l'inspiration était dépendante de la concentration d'une odeur. En ce qui concerne la qualité, la relation entre les propriétés physico-chimiques des molécules odorantes et la dynamique respiratoire n'est pas connue. En revanche, on sait que la qualité des molécules odorantes (Mozell, 1964 a,b) ainsi que la distribution et la sensibilité des neurorécepteurs conditionnent l'activation de l'EO (Pour revue, Scott, 2006). De plus, il a été montré que les variations de flux d'air pouvaient modifier la migration des molécules odorantes le long de l'EO (Yang *et al.*, 2007). Ces différentes données ont amené Schoenfeld et Cleland (2005) à suggérer que l'animal adapterait ses paramètres de flairage de façon à optimiser le dépôt des molécules odorantes sur les sites de l'EO les plus aptes à les recevoir. La façon de flairer les odeurs serait donc dépendante des propriétés physico-chimiques, de la qualité, des molécules odorantes. L'animal utiliserait ces variations de flairage lorsqu'il a besoin d'optimiser l'activation de l'EO, c'est-à-dire lorsqu'il doit discriminer des odeurs. Si cette hypothèse est vraie, dans une tâche de discrimination, un animal flairerait de la même façon des odeurs proches au sens physico-chimique et flairerait de façon différente des odeurs dissimilaires. Notre objectif dans cette dernière partie de ma thèse était de tester cette hypothèse. Il nous fallait donc avoir accès au signal respiratoire des animaux et impliquer les animaux dans une tâche de discrimination active. Nous avons combiné une méthode d'enregistrement non invasif de la respiration, le pléthysmographe, avec une tâche de discrimination olfactive à choix alternatifs (Uchida et Mainen, 2003).

Nous montrons que dans notre situation expérimentale, les animaux ont besoin de plusieurs cycles respiratoires pour échantillonner les odeurs et prendre leur décision. Nous avons observé que les paramètres du flairage peuvent être rapidement adaptés. Comme prédit par notre hypothèse, nous montrons que les animaux flairent de la même façon des odeurs proches. Confrontés à des odeurs dissimilaires, dans la moitié des cas analysés, les animaux flairent de façon très différente les odeurs ; dans l'autre moitié, les variations observées sont plus réduites. Cela signifie donc que l'animal peut bien adapter son flairage en fonction de la qualité des molécules mais que d'autres facteurs, comme nous le verrons dans la discussion, peuvent rentrer jeu. De plus, nous montrons que les animaux flairent différemment la même odeur selon la paire dans laquelle elle est présentée.
Finalement, il reste différentes questions auxquelles il faudra répondre, particulièrement est-ce que les variations observées permettent d'optimiser la discrimination olfactive.

3.4.2 Etude 3

3.4.2.1 Matériels et méthodes

3.4.2.1.1 Animaux

Des rats mâles Long-Evans (Charles River, l'Arbresle, France) pesant au début de l'expérience de 250 à 300g sont utilisés. Les animaux sont logés dans des cages individuelles au sein d'une pièce à 23 °C. Les rats sont maintenus sous un rythme jour/nuit de 12h (les lumières s'allumant à 6h du matin et s'éteignant à 6h du soir). La nourriture est disponible *ad libitum*. Les rats sont placés en restriction hydrique durant toute la phase expérimentale. L'eau est disponible durant la session comportementale et pendant 1 heure après chacune des sessions.

3.4.2.1.2 Enregistrement de la respiration

L'appareil consiste en une cage de pléthysmographie corps entier personnalisée (voir Fig. 28A, diamètre 20 cm, hauteur 30 cm, EMKA Technologies, France). La cage de pléthysmographie est placée dans un caisson permettant l'isolation acoustique, visuelle et électrique (longueur 60 cm, largeur 60 cm, hauteur 70 cm). Cette installation a été décrite en détail par Hegoburu *et al.* (2011). Le pléthysmographe est composé de deux chambres: une chambre où l'animal est placé et une chambre de référence. Un transducteur de pression différentielle (DPT modèle, EMKA Technologies), relié aux deux chambres, permet de mesurer des différences de pression entre les deux chambres. Ce signal reflète l'activité respiratoire du rat. Le signal mesuré est échantillonné à 1 kHz, et acquis avec un PC en utilisant une carte d'acquisition (MC-1608FS, mesure Computing, Norton, MA).

La cage de pléthysmographie a été équipée de trois ports (2 cm de diamètre intérieur, 2.5 cm de profondeur), chacun situé à une hauteur de 8 cm du fond de la cage. Le port central est entouré de deux ports latéraux situés à 6cm à gauche et à droite du port central. Le port central est connecté à un olfactomètre délivrant un débit d'air constant de 400ml/min. C'est au sein de ce port que les odeurs sont délivrées. De l'air désodorisé est poussé en permanence par le haut du pléthysmographe à un débit de 1100ml/min (voir Fig. 28A). Pour avoir une circulation constante des flux d'air dans la cage et ne pas avoir d'interactions avec le signal respiratoire de l'animal, une pompe aspire l'équivalent du débit d'air poussé dans le pléthysmographe, soit 1.5 l/min (1100ml/min + 400ml/min).

Les deux ports latéraux contiennent une pipette reliée à des pompes à eau. Chacun des ports est équipé de capteurs capacitifs permettant de détecter la présence du nez du rat dans le port central et les coups de langue sur chacun des ports latéraux.

3.4.2.1.3 Procédure comportementale

Tâche de discrimination olfactive

La tâche utilisée est une tâche de discrimination à choix alternatif. Cette tâche a été décrite dans Uchida et Mainen (2003). Brièvement, elle requiert 3 ports et 2 odeurs. Les rats commencent un essai en mettant leur nez dans le port central. Une odeur est alors délivrée pendant 3sec. Chaque odeur est associée à un port latéral: odeur A / port droit, odeur B / port gauche. Si l'animal fait le bon choix (bon côté), la récompense (60µL d'eau) est disponible jusqu'à 6 sec après le début de l'essai. L'intervalle inter-essai minimal est de 7sec (pour un exemple d'essai, voir la partie 2.3.3 et la figure 28B). Chaque jour le rat passe une session avec une paire d'odeur. Chaque session est composée d'environ 100 essais.

Le comportement animal est contrôlé à l'aide de deux caméras vidéo placées à chaque coin de la cage d'atténuation acoustique.

Odeurs

Un des paramètres important de la composition chimique des molécules odorantes semble être leur solubilité. Schoenfeld et Cleland (2005), dans un article de synthèse, ont réalisé un schéma bilan montrant la relation entre la solubilité des molécules odorantes et l'activation de l'EO (Fig. 31). Nous nous sommes appuyés sur cette synthèse pour choisir les odeurs. Ainsi, nous avons sélectionné des odeurs qui activent de façon différentes les différentes zones de l'EO et qui possèdent des caractéristiques physico-chimiques différentes. Par exemple, nous avons choisi le méthylbenzoate, une odeur qui donne les réponses les plus amples dans les domaines centraux de l'EO par rapport aux domaines périphériques et qui a un fort coefficient de solubilité. Nous avons également choisi le cinéole 1,8 qui donne des réponses amples dans les domaines périphériques de l'EO et qui est très peu soluble. Nous avons essayé d'avoir le plus d'odeurs représentatives de la courbe de la figure 31. De

plus, nous avons eu la chance de pouvoir communiquer avec le Dr. Scott qui nous a fourni des données non publiées supplémentaires pour réaliser la liste de nos odeurs et conseillé quant aux choix de ces dernières.

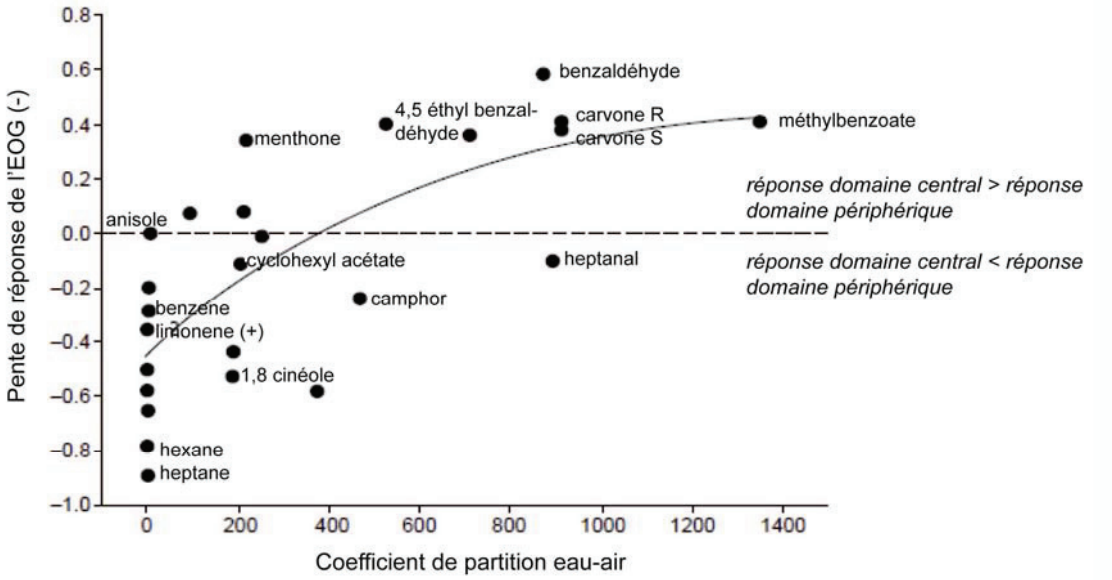


Figure 31 Pente de réponse EOG en fonction de la réponse des domaines de l'EO périphériques et centraux et du coefficient de partition eau-air des molécules odorantes. Figure d'après Schoenfeld et Cleland (2005).

Pré-sélection des odeurs avec une tâche de préférence spontanée des odeurs :

Dans l'introduction (paragraphe 1.3.4.4), on a pu voir que, chez l'Homme, l'hédonicité d'une odeur avait une influence au niveau de la respiration (Bensafi *et al.*, 2003). Afin de minimiser les effets liés à l'hédonicité dans notre tâche comportementale, nous avons réalisé une pré-sélection des odeurs. Pour cela, nous avons utilisé 6 rats naïfs (nourris et hydratés *ad libitum*). Dans une cage carrée de 50 cm de côté et de 40 cm de hauteur. Nous avons placé à équidistance du centre du carré deux petits pots en plastique de 5 cm de hauteur et de 2 cm de diamètre, perforés de trous de diamètre compris entre 1 et 2 mm. Ces pots sont remplis de granulés (polymères microporeux) absorbant les odeurs liquides. Deux cercles de 6 cm de diamètre sont tracés autour de ces pots.

Lors d'une première phase d'habituation, nous avons placé les rats dans l'enceinte avec les pots remplis de granulés mais sans odeur. Après 3 jours d'habituation, les odeurs ont été ajoutées aux granulés. Les odeurs, dans ce test, sont présentées deux à deux. Nous avons à la fois randomisé la présentation des paires d'odeurs et nous avons aussi fait varier les combinaisons d'odeurs présentées en même temps. Par exemple, dans une session, nous pouvons présenter la carvone R et la carvone S, et dans une autre la carvone S et le limonène +. Chaque jour, 3 sessions de 5 minutes par rat ont été réalisées. Nous avons mesuré le temps passé par chaque rat dans chaque cercle autour du pot odorisé.

Finalement, nous avons rejeté 2 odeurs de notre protocole. Effectivement, les 6 rats passaient moins de temps à explorer l'hexanal et l'heptanal que les autres odeurs utilisées. Nous avons donc retiré l'hexanal et l'heptanal de notre liste d'odeurs. Nous avons gardé les autres (ci-dessous).

Odeurs utilisées :

Nous utilisons différentes odeurs : Le méthylbenzoate (mbz), l'ethylbenzoate (etbz), les deux énantiomères de la carvone (carR et carS), les deux énantiomères du limonène (limM et limP), l'acétate d'isoamyle (iso), l'heptanol (hept), le cinéole 1,8 (cin8) et le p-cymène (p-cym). Dans le cadre de la tâche comportementale, il nous fallait regrouper les odeurs par 2. Nous avons réalisé des paires (une paire, P) sur la base de plusieurs critères (Tableau 2) :

- Nous souhaitions avoir des paires d'odeurs proches. Nous définissons le terme proche sur la base des propriétés physico-chimiques des molécules odorantes et de la réponse de l'EO. La première P proche est la P1. Elle correspond aux odeurs mbz et etbz. Ces deux odeurs n'ont qu'un seul groupe méthyl de différence (Tableau 2, formules développées). Nous avons ensuite formé les P2 et P3, respectivement composée des énantiomères de la carvone et des énantiomères du limonène. Au niveau des propriétés physico-chimiques, les énantiomères ont les mêmes caractéristiques (Tableau 2) et forment donc des paires idéales lorsque l'on souhaite avoir des odeurs proches. De plus, comme le montre la figure 31, les énantiomères donnent des réponses de l'EO très proches.

- Parce que notre hypothèse est que les animaux vont flairer de façon différente des molécules odorantes aux propriétés physico-chimiques différentes, nous avons constitué des paires contenant des odeurs dissimilaires. Tout d'abord nous avons la P4 (heptoh et iso). Ces deux odeurs donnent des réponses glomérulaires différentes (Schoenfeld et Cleland, 2005), ont des caractéristiques physico-chimiques très différentes avec un coefficient de solubilité ainsi que des pressions de vapeur différentes (Tableau 2). Nous avons ensuite composé la P7 (carS et limP) deux odeurs diamétralement opposées sur le graphique de Schoenfeld et Cleland (Fig. 31). Ces odeurs donnent des réponses de l'EO très différentes en fonction des zones (Scott-Johnson *et al.*, 2000, Pour revue Scott, 2006) et présentent des sensibilités différentes au flux d'air (Pour revue Scott, 2006). Ces deux odeurs ont également des pressions de vapeur différentes. Vu que la concentration en molécules odorantes dans l'air est liée à la pression de vapeur de la molécule, on considère souvent que plus la pression de vapeur est forte plus la perception de l'odeur sera intense. Pour prévenir la critique probable que des différences d'effets pourraient être uniquement dues à des différences de pression de vapeur, nous avons composé deux autres paires, toutes deux contenant des odeurs physico-chimiquement différentes mais possédant des pressions de vapeur semblables (Tableau 2). La P5 est composée du cin8 et du p-cym, ces deux odeurs ont des pressions de vapeur semblables (respectivement, 1.649 et 1.655 mmHg). En revanche, elles possèdent des caractéristiques physico-chimiques différentes (Tableau 2). Ensuite, nous avons composé la P6 contenant l'heptanol et le mbz. Ces deux odeurs ont des pressions de vapeur proches (0.325 vs 0.34mmHg) mais ne possèdent pas les mêmes

caractéristiques physico-chimiques et donnent des réponses glomérulaires différentes (Schoenfeld et Cleland, 2005).

- Enfin, nous avons également composé ces paires de façon à retrouver la même odeur dans deux paires différentes (P 1, 2, 3, 6 et 7). Nous souhaitions ainsi tester si une odeur était associée à un pattern respiratoire spécifique ou si ce pattern pouvait varier en fonction de la P dans laquelle l'odeur était présentée.

La présentation des paires a été randomisée, seule la P1 a été la première P à être apprise par l'ensemble des rats.

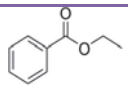
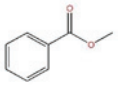
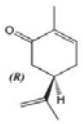
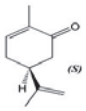
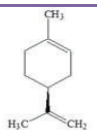
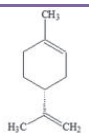
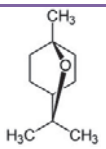
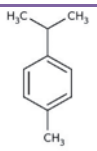
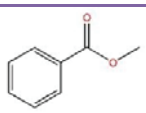
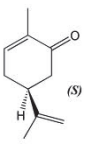
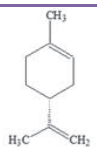
Paires proches	**P1**		**P2**		**P3**	
Odeur	etbz	mbz	carR	carS	limM	limP
Formule développée						
Pression de vapeur (mmHg à 25°C)	0,18	0,34	0,066	0,066	1,54	1,54
Log octanol/eau	2,32	1,83	3,07	3,07	4,83	4,83
Log solubilité dans l'eau	2,64	2,12	367,1	367,1	4,38	4,38
Log Henry	0,66	0,54	0,89	0,89	4,58	4,58
Log octanol/air	2,64	2,12	2,71	2,71	4,38	4,38
Fraction absorbée dans l'air (phi[e6])	3,04	2,14	7,89	7,89	0,56	0,56
Paires Dissimilaires	**P4**		**P5**		**P6**	**P7**	
Odeur	hept	iso	cin8	pcym	hept	mbz	carS	limP
Formule développée								
Pression de vapeur (mmHg à 25°C)	0,325	5,68	1,649	1,655	0,325	0,34	0,065	1,54
Log octanol/eau	2,31	2,26	3,13	4	2,31	1,83	3,07	4,83
Log solubilité dans l'eau	2,62	2,25	332,1	4,1	2,62	2,12	367,1	4,38
Log Henry	0,37	1,74	1,30	3,06	0,37	0,54	0,89	4,58
Log octanol/air	2,62	2,25	2,74	4,1	2,62	2,12	2,71	4,38
Fraction absorbée dans l'air (phi[e6])	3,47	0,145	0,43	0,5	3,47	2,14	7,89	0,56

Tableau 2 Table récapitulative des paires et odeurs utilisées ainsi que leur formule développée : éthylbenzoate (etbz) ; méthylbenzoate (mbz) ; la carvone R (carR) ; carvone S(carS) ; limonène – (limM) ; (limP) ; l'heptanol (hept) ; l'isoamyl acétate(iso) ; cinéole 1,8 (cin8) ; p-cymène (pcym). Tous les paramètres physico-chimiques présentés ont été relevés sur ChemSpider dont les données sont générées à partir de l'ACD / Labs ACD / PhysChem Suite et de l'US Environmental Protection Agency's EPISuite™.

3.4.2.1.4 Traitement de l'information

Les événements suivants sont enregistrés et stockés dans une base de données mySQL couplée à un logiciel de traitement du signal OpenElectrophy (Garcia et Fourcaud-Trocmé, 2009):

- durée de la présence du nez du rat dans le port à odeur
- déclenchement de l'odeur
- nombre de coups de langue
- déclenchement des pompes à eau
- signaux respiratoires

OpenElectrophy est un logiciel open source et est disponible gratuitement sur http://neuralensemble.org/trac/OpenElectrophy.

Analyse du signal respiratoire

Avec le pléthysmographe, le signal respiratoire apparait comme un phénomène périodique montrant une alternance de négativités (inspiration) et positivités (expiration). Pour détecter les différentes phases respiratoires, grâce aux points de passage à 0, nous utilisons un algorithme décrit dans une étude précédente (Roux *et al.*, 2006). Cet algorithme effectue deux opérations principales: le lissage du signal pour réduire le bruit et la détection des points de passage à zéro dans le but de définir avec précision les transitions entre inspiration et expiration et entre expiration et inspiration. L'inspiration commence lorsque le signal croise le 0 et devient négatif, elle se termine quand le signal recroise le 0, l'inspiration correspond donc aux déflexions négatives du signal. L'expiration est représentée par les déflexions positives du signal, commence lorsque le signal croise le 0 et devient positif et se termine quand le signal recroise le 0 (Fig. 32A). Pour de plus amples détails, voir : Hegoburu *et al.* (2011) et Courtiol *et al.* (2011b). Afin d'éliminer les artefacts de détection des cycles, nous déterminons des valeurs limites en deçà desquelles le signal est rejeté : une durée < médiane/6 et une amplitude < médiane/6.

Paramètres du signal respiratoire mesurés

Avant chaque session, le pléthysmographe est calibré. Nous poussons un volume de 1mL d'air dans la chambre basse, cela va produire une variation de pression dans la cage. Nous enregistrons cette variation et nous savons alors qu'une telle variation correspond à un volume de 1mL. Grâce à cette calibration, nous avons accès aux paramètres de volume. Nous mesurons et analysons : l'amplitude de l'inspiration (Ai), l'amplitude de l'expiration (Ae), la durée d'inspiration (Di), la durée d'expiration (De), la durée totale d'un cycle respiratoire (Dt), le volume d'inspiration (Vi) et le volume de l'expiration (Ve) de chaque cycle respiratoire (Fig. 32B).

Afin de pouvoir comparer les valeurs des cycles respiratoires entre rats et au cours du temps, nous avons normalisé les valeurs des cycles respiratoires. Pour avoir une normalisation fine, nous avons décidé de normaliser la valeur des paramètres de chaque cycle par les valeurs du précédent. Par exemple, les valeurs du 2ème cycle après l'arrivée de l'odeur sont divisées par la valeur des paramètres du 1er cycle après l'arrivée de l'odeur. Cela nous permet de normaliser les valeurs de chaque cycle et de prendre en compte le cycle précédent. En ce qui concerne les paramètres d'échantillonnage, comme la durée de présence dans le port à odeur, nous n'avons pas appliqué de normalisation.

Analyse comportementale

Grâce aux capteurs capacitifs, nous pouvons enregistrer et stocker : la durée de la présence du nez du rat dans le port à odeur et le nombre de coups de langue sur chaque pipette. Nous enregistrons aussi le temps de présentation de l'odeur. Nous pouvons ainsi déterminer quand le rat donne une bonne réponse (réussite), c'est-à-dire lorsqu'il lèche la pipette du port latéral associé à l'odeur, ou alors lorsqu'il donne une mauvaise réponse (échec), quand il se trompe de côté.

Nous considérons que l'animal réussit à discriminer les odeurs lorsque ce dernier atteint un pourcentage de réussite d'au moins 70% sur chacun des côtés et ce sur deux jours consécutifs.

3.4.2.1.5 Statistiques

Des scripts python (scipy.stats), Excel et Statview ont été utilisés pour réaliser l'ensemble des statistiques.

Nous avons tout d'abord mesuré la durée moyenne d'échantillonnage (durée passée dans le port à odeur) sur l'ensemble des essais. Nous avons retiré les essais avec une durée > à la moyenne de la durée d'échantillonnage + 2 déviations standards.

Lorsque nous comparons les paramètres respiratoires ou d'échantillonnage dans deux conditions, nous utilisons un test-t non apparié. Lorsque nous comparons ces paramètres soit avec plus d'un facteur soit avec un facteur à plus de deux catégories, nous utilisons une ANOVA factorielle. Le seuil de significativité a été fixé à 0.05 (*). ** représente un niveau de significativité de $p<0.01$; *** un niveau de $p<0.001$.

3.4.2.1.6 Validations

Pour valider le système d'enregistrement de la respiration couplé à la tâche comportementale, nous avons entrainé 3 rats. Nous avons présenté le limonène à deux concentrations différentes. Nous avons pu observer, comme Youngentob *et al.* (1987), que lorsque l'animal est confronté à la même odeur plus faiblement concentrée, il augmente l'amplitude de son inspiration (Fig. 32C). Ce résultat confirme donc que grâce à notre matériel expérimental, nous pouvons enregistrer des variations fines de respiration et reproduire des données déjà publiées.

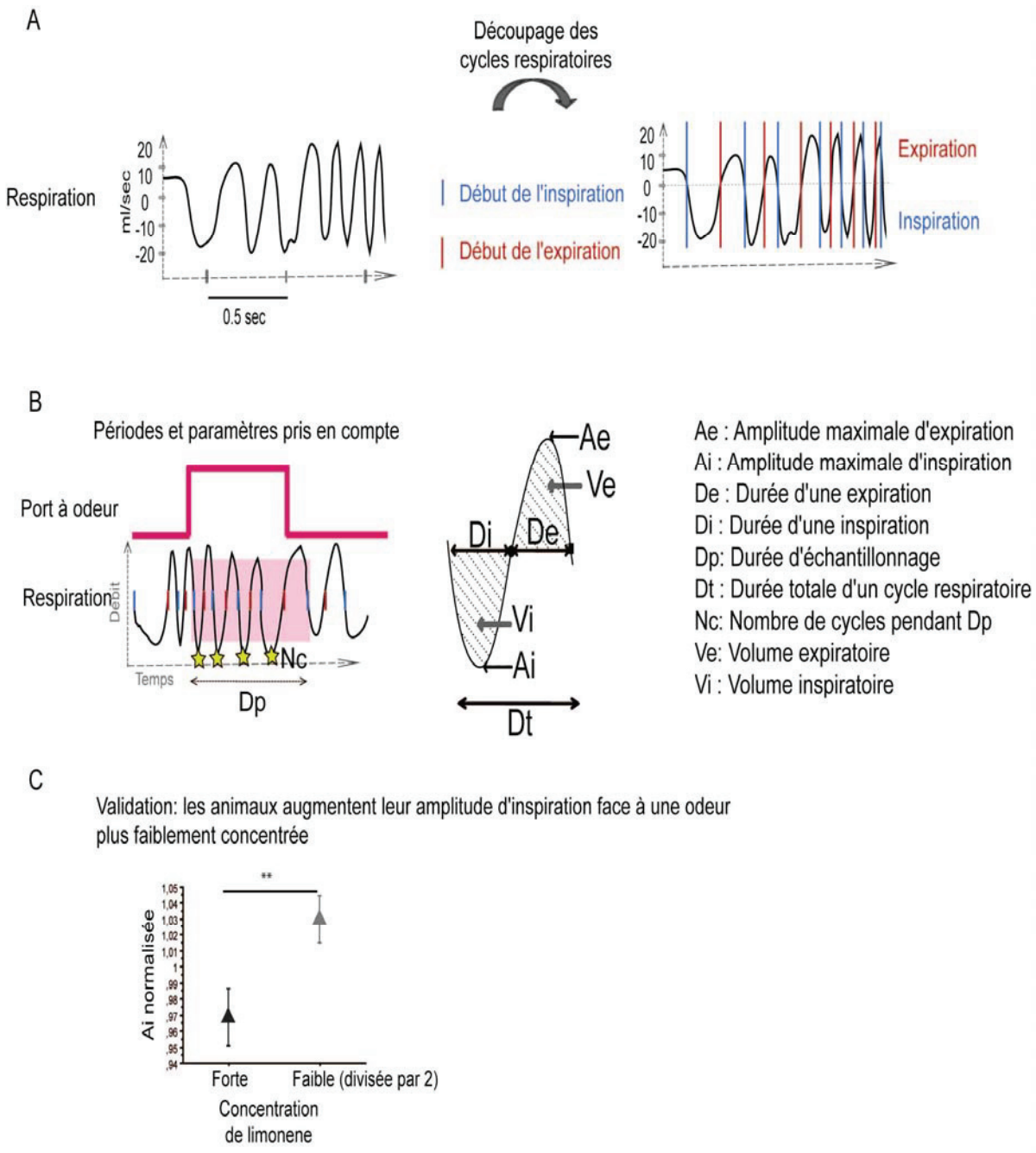


Figure 32: Traitement des cycles respiratoires et validation du matériel expérimental. A) A gauche, on retrouve un tracé brut de respiration enregistrée par le pléthysmographe. Un algorithme est appliqué de façon à détecter les points de passage à zéro. A droite, les traits bleus représentent la détection du début de la phase inspiratoire et les traits rouges représentent le début de la phase expiratoire. B) A gauche, est représentée une entrée dans le port à odeur (trait rose) et les cycles respiratoires. On retrouve les détections des phases inspiratoires et expiratoires (traits rouges et bleus). Les cycles respiratoires pris en compte dans l'analyse sont ceux compris dans le carré rose et correspondent au premier cycle respiratoire dont l'inspiration arrive après l'arrivée dans le port à odeur jusqu'au dernier cycle respiratoire dont l'inspiration arrive avant la fin du port à odeur. On peut mesurer le nombre de cycles respiratoires dans cette période (Nc, étoiles jaunes) ainsi que la durée passée dans le port à odeur (Dp, flèche noire horizontale). A droite, on retrouve un cycle respiratoire et les paramètres mesurés sur ce cycle. C) le limP a été présenté à 3 rats à deux concentrations différentes : forte et faible (respectivement 2.10^{-1} (n=141) et 1.10^{-1} (n=167) de la pression de vapeur saturante). L'amplitude de l'inspiration a été mesurée et normalisée. On observe que lorsque les rats sont confrontés à une plus faible concentration de limP, ils augmentent significativement leur amplitude d'inspiration. La moyenne est exprimée ± SEM. Statistique :test-t non apparié, t=2.675, p<0.01, **.

3.4.2.2 Résultats

Nos hypothèses de travail sont 1) que le flairage est un acte olfacto-moteur, par conséquent il est adaptable très rapidement et 2) qu'un animal va adapter sa façon de flairer afin d'optimiser le transport des molécules odorantes sur les sites de l'EO les plus aptes à les recevoir. Si notre hypothèse est vraie, lorsque l'animal est confronté à des odeurs proches (au sens physico-chimique), il doit les flairer de la même façon. Lorsque l'animal est confronté à des odeurs très différentes, il doit alors les flairer différemment.

Les résultats sont basés sur l'analyse des signaux respiratoires de 5 rats avec un total de 2722 essais réussis. Parce que les rats ont mis plus ou moins de temps à apprendre et à réaliser la tâche, en un temps donné, 3 des 5 rats ont pu réaliser l'ensemble des paires, 1 autre les a toutes réalisées sauf la P5 et enfin un dernier n'a pas eu le temps de réaliser les P4, P5 et P6. Il est à noter que nous réalisons les comparaisons par paire d'odeurs, cela ne change donc pas le n moyen dans chacune des conditions.

L'analyse porte sur les signaux respiratoires de la session où les animaux ont atteint un score supérieur ou égal à 70% de réussite. Nous n'avons considéré que les signaux respiratoires contenus dans la période de présence dans le port à odeur. Sauf lorsque précisé, nous n'avons considéré que les périodes où l'animal a donné une réponse comportementale correcte.

3.4.2.2.1 Plusieurs cycles respiratoires sont nécessaires pour discriminer les odeurs.

Avant de s'intéresser aux paramètres intrinsèques au cycle respiratoire, nous avons tout d'abord analysé la façon globale d'échantillonner des animaux: nombre de cycles respiratoires pendant la présence dans le port (Nc) et durée de la présence dans le port à odeur (Dp). Le Nc correspond au nombre de cycles pris pour l'échantillonnage et la prise de décision (dans le port à odeur). La figure 33A représente la distribution du Nc pour l'ensemble des odeurs, toutes paires confondues, et la figure 33B, la Dp. Nous avons observé que, pour les essais réussis, les animaux échantillonnent l'odeur avec un Nc moyen de 3.5 cycles (+/- 0.024 ; une médiane de 3) et une Dp moyenne de 0.481 sec (SEM +/- 0.003 ; une médiane de 0.477). Dans notre situation expérimentale et sur l'ensemble de nos essais, seuls 5.2 % des essais réussis le sont avec un seul cycle respiratoire (Fig. 33A). Cela illustre donc l'importance pour l'animal de pouvoir prendre plusieurs cycles respiratoires. Si l'on compare maintenant pour l'ensemble des odeurs utilisées le nombre de cycles respiratoires lors des échecs et lors des réussites comportementales, on peut observer que lorsque l'animal a donné une réponse comportementale erronée, il a pris significativement moins de cycles respiratoires ($t= -3.838$, $p<0.0001$) ou est resté moins longtemps dans le port à odeur ($t = -3.295$, $p<0.01$) que lorsqu'il a donné une réponse comportementale correcte (Fig. 33B).

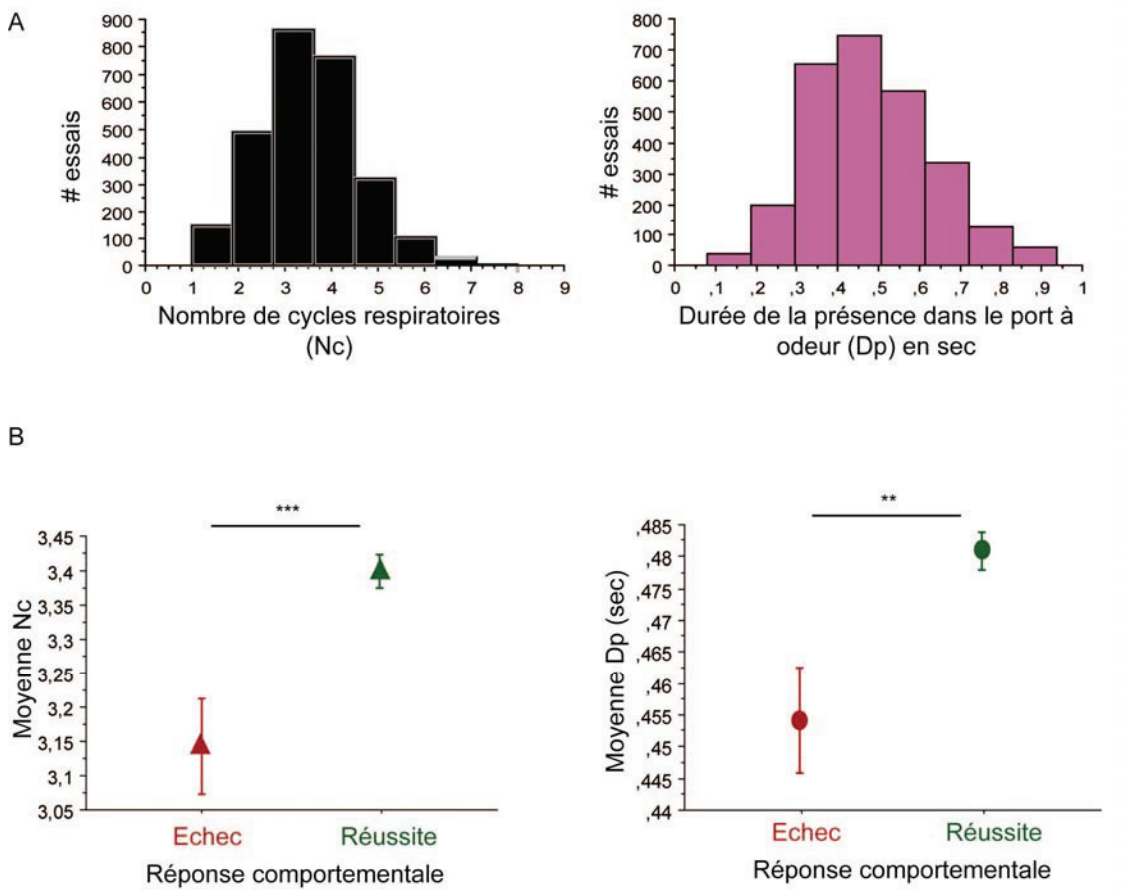


Figure 33 Les rats prennent en moyenne 3,5 cycles respiratoires et restent dans le port à odeur 0.5 sec lorsqu'ils discriminent les odeurs. A) A gauche, histogramme de distribution du nombre de cycles respiratoires pendant la période de présence au port (Nc), toutes paires et odeurs confondues. A droite, histogramme de distribution de la durée de présence dans le port à odeur (Dp), toutes paires et odeurs confondues n=2722. B) A gauche, comparaison du Nc moyen en fonction de la réponse comportementale (échec en rouge n= 415 et réussite en vert n= 2722). L'animal prend significativement plus de cycles respiratoires quand il a réussi que quand il s'est trompé (t= -3.838, p<0.001). A droite, comparaison de la Dp moyenne en fonction de la réponse comportementale (échec en rouge et réussite en vert). L'animal reste significativement plus de temps dans le port à odeur quand il a réussi que lorsqu' il s'est trompé (t= -3.295, p<0.01). La moyenne est exprimée ± SEM. Statistique : test-t non apparié, p<0.01 ** et p<0.001 ***.

Comme les animaux réalisent une tâche de discrimination active avec deux odeurs, nous avons analysé les paramètres d'échantillonnage et respiratoires non pas pour chaque odeur prise individuellement mais pour chaque paire d'odeurs. La figure 34 représente la moyenne du nombre de cycles respiratoires pris (Nc) pour chacune des odeurs de chaque paire utilisée (chaque paire est représentée par une couleur spécifique).

Comme le prédit notre hypothèse, nous n'avons pas observé de différence significative du Nc entre les odeurs proches dans les P1, P2 et P3 (Fig. 34). Pour les paires contenant des odeurs dissimilaires, nous avons observé pour deux de ces quatre paires, une différence significative du Nc. Ainsi, les animaux prennent significativement moins de cycles quand l'iso est présentée par rapport à l'hept (P4 ; t= 9.5, p<0.0001). De la même façon, dans la P6, nous avons observé que les rats prenaient significativement moins de cycles avec l'hept qu'avec le mbz (t= -4.104, p<0.0001 ; Fig. 34).

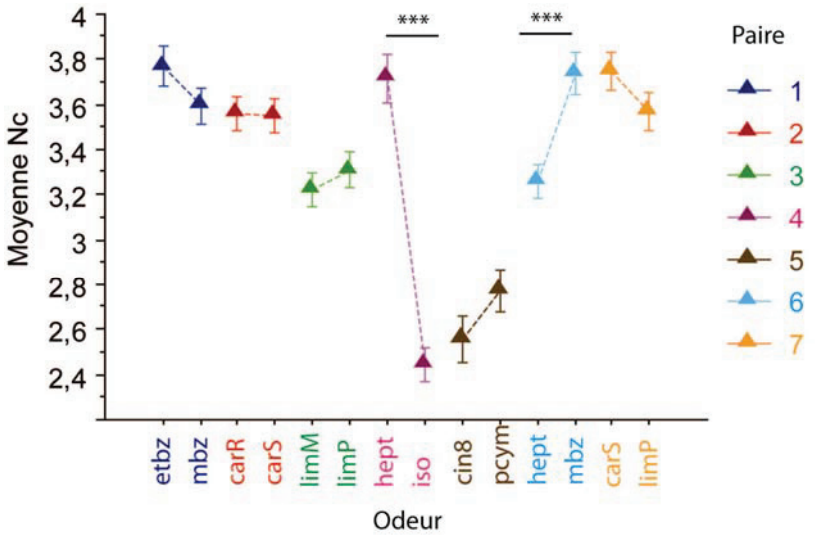


Figure 34 Nombre de cycles respiratoires dans chacune des paires en fonction des odeurs. Nombre moyen de Nc pour chacune des paires (P1 en bleu, P2 en rouge, P3 en vert, P4 en rose, P5 en marron, P6 en cyan et P7 en orange, le nombre d'essais pour chaque odeur est reporté dans la table supplémentaire 1, en fin de discussion) et en fonction des odeurs. Le Nc est comparé entre odeurs d'une même paire. Nous n'avons pas observé de différence significative entre les odeurs des paires 1, 2, 3, 5 et 7. En revanche, une différence significative apparait dans la P4 (t= 9.5, p<0.0001) et dans la P6 (t= -4.104, p<0.0001). La moyenne est exprimée ± SEM. Statistique : test-t non apparié, p<0.001 ***.

Nous avons retrouvé les mêmes niveaux de différence et de significativité avec la Dp. Il est à noter que les différences observées pour le Nc et la Dp apparaissent dans deux paires. Les deux paires concernées sont toutes deux composées d'odeurs dissimilaires mais l'une avec des pressions de vapeur différentes (P4) et l'autre avec des pressions de vapeur semblables (P6 ; Tableau 2).

L'animal fait donc varier, pour certaines paires, sa façon globale d'échantillonner en prenant plus ou moins de cycles respiratoires et en restant plus ou moins longtemps dans le port à odeur. L'animal peut également jouer plus finement sur sa façon d'échantillonner, en adaptant les paramètres intrinsèques au cycle respiratoire. Nous avons donc analysé chaque cycle respiratoire pendant la période d'échantillonnage. Nous souhaitons déterminer si 1) ces paramètres sont rapidement modulables et 2) et si ces modulations sont liées aux odeurs.

3.4.2.2.2 Des variations rapides et complexes des paramètres respiratoires en fonction des odeurs

Toutes odeurs confondues, les animaux prennent en moyenne 3,5 cycles respiratoires pour échantillonner l'odeur. Cette moyenne varie entre et au sein des paires d'odeurs allant d'un minimum de 2.5 (iso dans P4) à un maximum de 3.8 (etbz dans P1). Par conséquent, nous avons décidé de focaliser l'analyse sur les trois premiers cycles respiratoires suivant l'arrivée de l'odeur. Pour chacun de ces cycles, nous avons mesuré différents paramètres : la durée, l'amplitude et le volume d'inspiration ainsi que la durée, l'amplitude et le volume d'expiration (Fig. 32B). Le volume inspiratoire est à la fois dépendant de la durée et de l'amplitude d'inspiration. Le volume expiratoire est majoritairement dépendant de la durée d'expiration. L'amplitude d'expiration, elle, ne présente

que peu ou pas de modifications en fonction des différentes conditions. Par conséquent et pour simplifier la présentation des résultats, nous avons étudié la durée d'inspiration, l'amplitude d'inspiration et la durée d'expiration des trois premiers cycles respiratoires suivant l'arrivée de l'odeur.
Dans la suite des résultats, je qualifierai de 1er, 2ème ou 3ème cycle, les 1er, 2ème et 3ème cycles respiratoires survenant après l'arrivée de l'odeur.

La figure 35 représente, du haut vers le bas, la durée d'inspiration normalisée (Di), l'amplitude d'inspiration normalisée (Ai) et la durée d'expiration normalisée (De). Ces valeurs normalisées sont représentées par paire d'odeur et également, de gauche à droite, par les valeurs du 1er, 2ème et du 3ème cycle respiratoire (pour la méthode de normalisation des données, se reporter à la partie Matériels et Méthodes 3.4.2.1.4).

Nous nous sommes tout d'abord intéressées au moment où ces variations apparaissent (1er, 2ème ou 3ème cycle respiratoire). Dans la majorité des cas, nous n'avons pas observé de variations significatives des paramètres respiratoires au 1er cycle suivant l'arrivée de l'odeur (un effet sur une paire pour la Di et un pour la De, Fig. 35). De plus, comme on peut le voir sur la figure 35, les variations les plus amples entre odeurs s'expriment majoritairement à partir du 2ème cycle respiratoire pour l'expiration et à partir du 3ème cycle respiratoire pour l'inspiration. Ces modulations sont très rapides puisqu'elles interviennent juste après le 1er cycle respiratoire qui en moyenne ne dure que 127 ms. Nous nous sommes donc principalement focalisées sur les 2èmes et 3èmes cycles respiratoires suivant l'arrivée de l'odeur. Afin de simplifier la lecture des résultats, nous avons également réalisé une figure bilan (Fig. 36) résumant les différentes modifications de Di et De observées sur les 2ème et 3ème cycles pour chaque paire d'odeurs étudiée[4].

[4] Pour avoir l'ensemble des valeurs statistiques de toutes les paires pour les trois paramètres, se reporter à la légende de la figure 35.

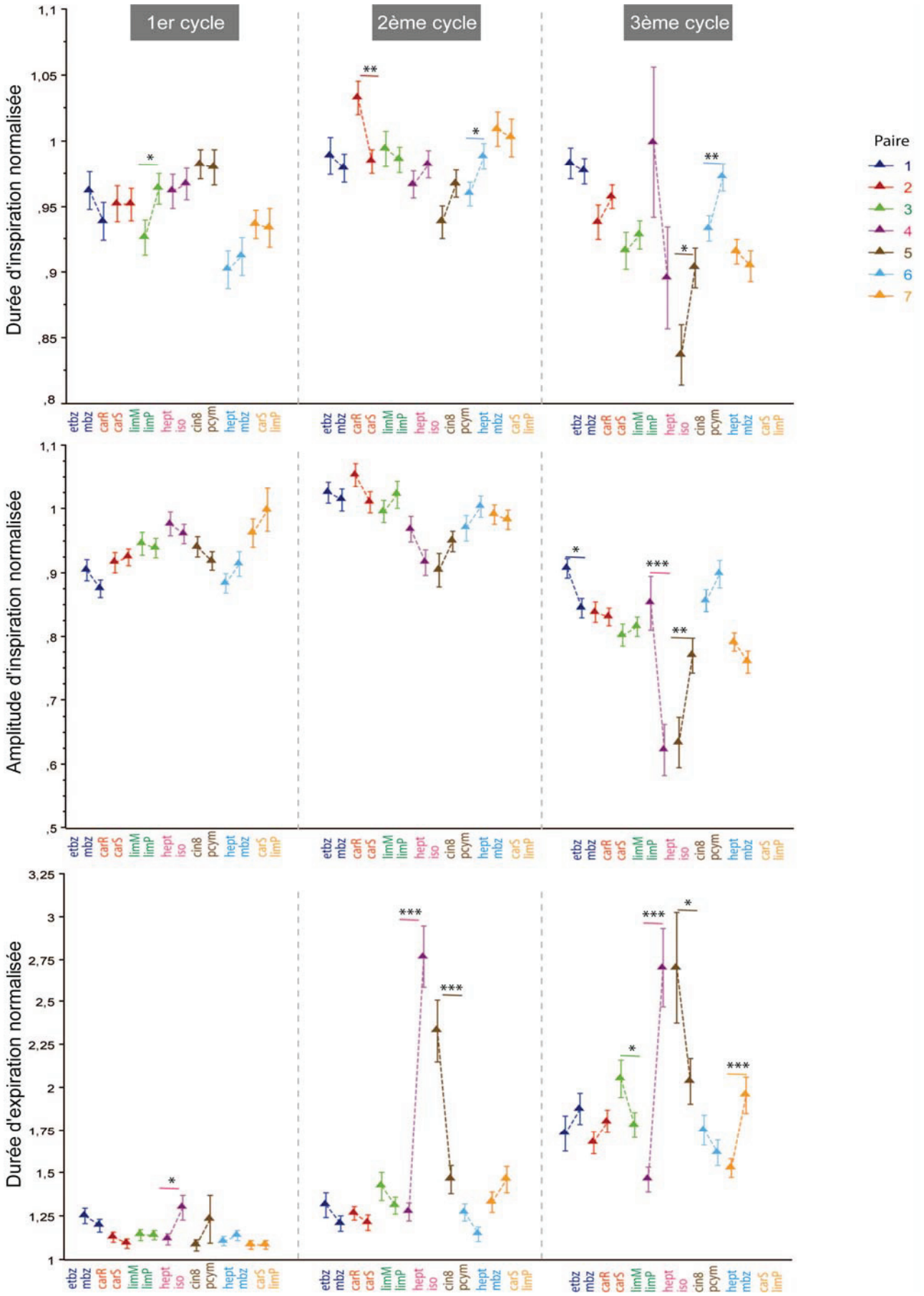


Figure 35 : Modulations des paramètres respiratoires aux 1ers, 2èmes et 3èmes cycles par paire et en fonction des odeurs. On retrouve le code couleur des paires utilisé dans la figure 34. La normalisation de chaque paramètre est comme suit : pour le 1er cycle, c'est la valeur du 1er cycle sur celle du précédent, pour le 2ème cycle, c'est la

valeur du 2ème cycle sur celle du 1er cycle ; pour le 3ème cycle, c'est la valeur du 3ème cycle sur celle du 2ème . Du Haut vers le bas : Durée d'inspiration normalisée moyenne pour chacune des paires et en fonction des odeurs. Au 1er cycle, on retrouve une différence significative entre odeurs de la P4 t = -2.098 p<0.05. Au 2ème cycle, on retrouve une différence significative entre odeurs de la P2 (t=3.106, p<0.01) et de la P6 (t=-2.166, p<0.05). Au 3ème cycle, on observe une différence significative entre odeurs de la P5 (t=-2.536, p<0.05), et de la P6 (t=-2.728, p<0.01). Le graphique au centre représente l'amplitude d'inspiration normalisée moyenne pour chacune des paires et en fonction des odeurs. Aux 1er et 2ème cycles, aucune différence significative n'est observée. Au 3ème cycle, on observe une différence significative entre odeurs de la P2 (t=2.851, p<0.01), de la P4 (t=3.578, p<0.001) et de la P5 (t=-2.878, p<0.01). Enfin, tout en bas, on retrouve la durée d'expiration normalisée moyenne pour chacune des paires et e fonction des odeurs. Au 1er cycle, une différence significative entre odeurs de la P4 apparait (t=-2.377, p<0.05). Au 2ème cycle, on retrouve une différence significative entre odeurs de la P4 (t=-8.107, p<0.001) et de la P5 (t=4.576, p<0.001). Au 3ème cycle, on observe une différence significative entre odeurs de la P3 (t=2.87, p<0.05), de la P4 (t=-6.306, p<0.001), de la P5 (t=-2.118, p<0.05), et de la P7 (t=-3.773, p<0.001). Le nombre d'essais pour chaque odeur est reporté dans la table supplémentaire 1, en fin de discussion. La moyenne est exprimée ± SEM. Statistiques : test-t non apparié, p<0.05 *, p<0.01 ** et p<0.001 ***.

Comme nous l'avions prédit, nous n'avons observé que peu de différence dans les paramètres respiratoires évoqués par des odeurs de paires proches (P1, P2 et P3; Fig. 35). Prenons l'exemple de la P2 (carR et carS): parmi tous les paramètres analysés sur les 3 cycles, seule la Di du 2ème cycle est différente entre carR et carS. C'est ce qui est schématisé sur la figure 36.

En ce qui concerne les paires d'odeurs dites dissimilaires, nous avons observé de nombreuses différences significatives pour la moitié des paires dissimilaires (Fig. 35 et schématisé sur la Fig. 36). Effectivement lorsque l'on analyse les paires 4 et 5, on observe des différences entre odeurs à la fois sur la Di, l'Ai et la De. Par exemple, les animaux inspirent avec une amplitude significativement plus grande l'hept que l'iso lors du 3ème cycle respiratoire (t=3.578 ; p<0.001 ; Fig. 35). De la même façon, ils inspirent significativement plus le p-cym que le cin8 (t=2.878 ; p<0.01 ; Fig. 35). De plus, la façon d'expirer les odeurs va elle aussi être modulée. Comme on peut le voir, dès le 2ème cycle respiratoire, les animaux expirent significativement plus longtemps l'iso que l'hept et plus le cin8 que le pcym (respectivement, t=-8.107, p<0.001 ; t=4.576, p<0.001). Cette différence est maintenue au 3ème cycle respiratoire (P4 t= -6.306, p<0.001 ; P5 t= 2.118, p<0.05). Il est à noter que ces deux paires (P4 et P5) sont toutes les deux composées d'odeurs dissimilaires mais l'une avec des pressions de vapeur différentes (P4) et l'autre avec des pressions de vapeur semblables (P5). En ce qui concerne les paires 6 et 7, les variations existent mais sont moins nombreuses. Prenons l'exemple de la P6, les seules différences significatives observables concernent la Di aux 2èmes et 3èmes cycles (2ème cycle : t=-2.166, p<0.05 ; 3ème cycle : t=-2.728, p<0.01).

Ce qui est tout de même commun à trois des paires d'odeurs dissimilaires, c'est que lorsqu'une variation entre odeur apparait au 2ème cycle, elle est maintenue au 3ème cycle, comme le montre la figure 36 pour les Di et De.

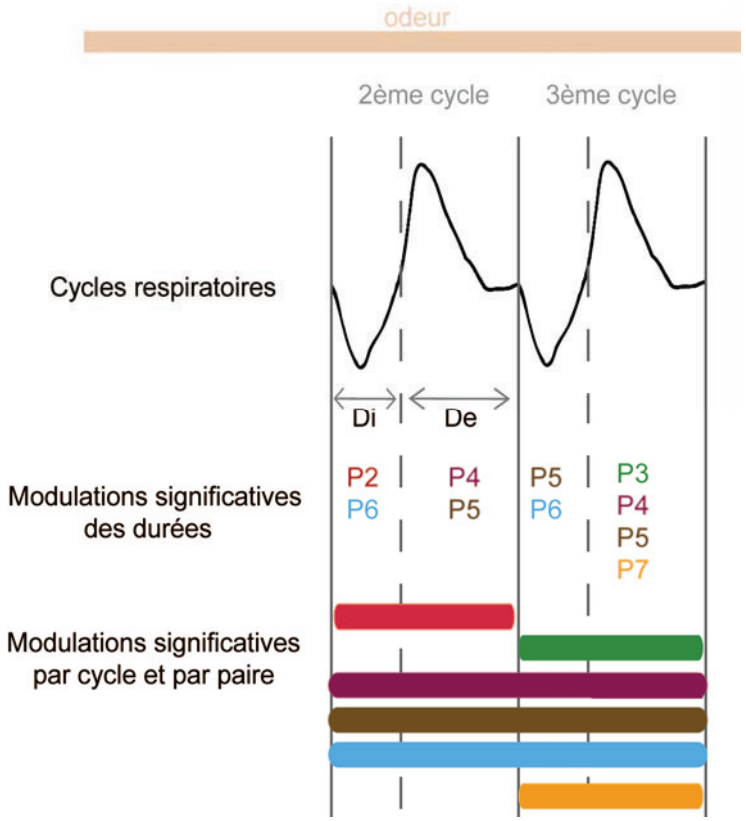


Figure 36 : Représentation schématique des variations significatives de Di et De apparaissant aux 2ème et 3ème cycles respiratoires entre odeurs d'une même paire. En haut sont représentés respectivement le 2ème et le 3ème cycle respiratoire après l'arrivée de l'odeur (saumon). Les paires où une différence significative est apparue sont notées. Par exemple, une différence significative entre odeurs de la P2 est arrivée au 2ème cycle respiratoire lors de l'inspiration. En bas et en reprenant le code couleur des paires, sont représentées les variations significatives sur le cycle respiratoire (inspiration et expiration cumulées).

De façon intéressante, les paires (P4 et P5) où apparaissent les variations importantes et précoces dès le 2ème cycle respiratoire au niveau de la De, sont aussi les paires où les animaux ont pris le moins de cycles pour échantillonner l'odeur et prendre leur décision (Fig. 34). Sur la figure 37A sont représentés pour chaque paire, le pourcentage d'essais où les animaux ont pris 2 cycles et ceux où ils en ont pris au moins 3. Très clairement, pour les paires 1, 2, 3, 6 et 7, les animaux ont pris dans plus de 75 % des cas au moins 3 cycles. En revanche pour les paires 4 et 5, ce pourcentage est moins élevé, respectivement 65.26 % et 57.79%. Nous nous sommes donc demandé si nous allions retrouver les variations de De lorsque nous analysions séparément les essais où les animaux n'avaient pris que 2 cycles de ceux où ils en avaient pris au moins 3. Nous nous sommes intéressées à la De, car c'est un paramètre fortement modulé, qui plus est dès le 2ème cycle respiratoire. Lorsque l'on considère les essais où l'animal a pris 2 cycles respiratoires, on observe au 2ème cycle respiratoire d'importantes variations. Ainsi, l'animal augmente significativement sa De lorsqu'il flaire l'iso par rapport à l'hept ($t=-5.204$, $p<0.001$). De même, il augmente significativement sa De lorsqu'il faire le cin8 par rapport au pcym ($t=3.633$, $p<0.001$). Lorsque l'animal a pris 3 cycles respiratoires ou plus, de façon très intéressante, on observe que les variations de De au 2ème cycle sont faibles avec une absence de significativité pour la P5 (Fig. 37B). Pour la P4, on retrouve un effet significatif ($t=-2.048$, $p<0.05$) mais il faut noter que l'amplitude de cette variation est bien inférieure à celle apparaissant au 3ème cycle. Au 3ème cycle respiratoire, on

retrouve que l'animal augmente sa De lorsqu'il flaire l'iso et le cin8 par rapport à l'hept et au pycm, respectivement.

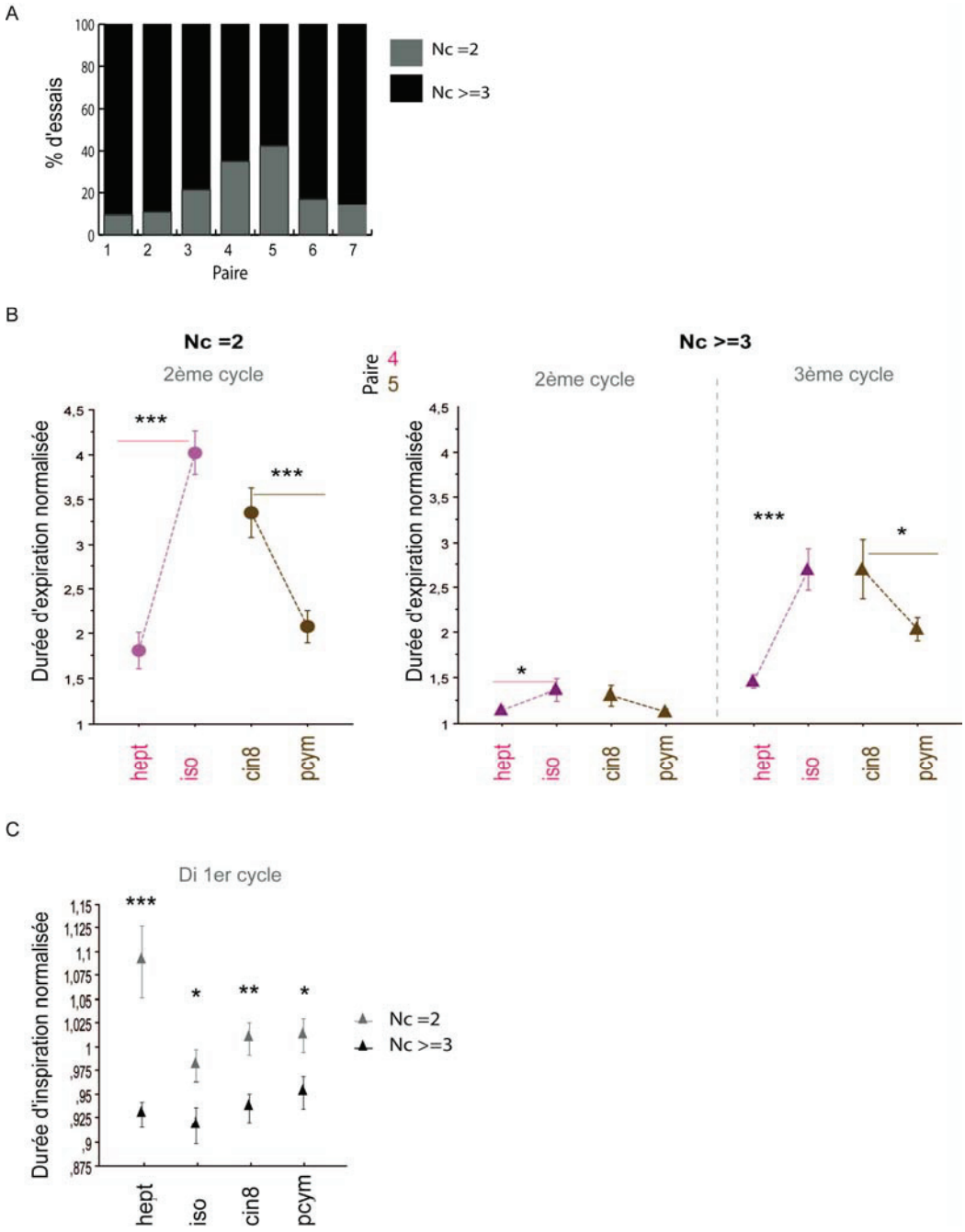


Figure 37 Le cycle où apparait la différence de flairage entre deux odeurs est lié au nombre total de cycles pris et à la durée du 1er cycle. A) Pourcentage d'essais par paire d'odeurs où les animaux ont pris soit 2 cycles (gris) soit 3 cycles ou plus (noir) pour discriminer. B) Durée d'expiration normalisée moyenne par paire en fonction des odeurs et du nombre de cycles pris. La normalisation de la durée est identique à celle prise dans la figure 35. Les deux paires où les animaux ont pris le plus d'essais avec 2 cycles sont présentées. A gauche, on retrouve les valeurs des 2èmes cycles lorsque l'animal n'a pris que 2 cycles respiratoires. A droite, on retrouve les valeurs des 2èmes et 3èmes cycles lorsque les animaux ont pris 3 ou plus cycles respiratoires. n 2ème cycle, lorsque l'animal a pris 2 cycles respiratoires : P4 n_{hept}=27, n_{iso}=72, P5 n_{cin8}=51, n_{pcym}=41 ;n 2ème cycle, lorsque l'animal a pris 3 cycles respiratoires ou plus : P4 n_{hept}=121, n_{iso}=65, P5 n_{cin8}=51, n_{pcym}=75 ; n 3ème cycle : P4 n_{hept}=121, n_{iso}=65, P5 n_{cin8}=51, n_{pcym}=75. C) Durée de la première inspiration suivant l'arrivée de l'odeur selon que l'animal ait pris 2 cycles (gris) ou 3 cycles et plus (noir) pour échantillonner l'odeur. Les n sont identiques à B. Hept t=4.887, p<0.001 ; iso t=2.472, p<0.05 ; cin8 t=3.251, p<0.01, pcym t=2.278, p<0.05. La moyenne est exprimée ± SEM. Statistique : test-t non apparié, p<0.05 * ; p<0.01 ** et p<0.001 ***).

Lorsque l'animal prend au moins 3 cycles respiratoires, les variations majeures arrivent au 3ème cycle, lorsqu'il n'en prend que 2, ces variations apparaissent de façon plus précoce, dès le 2ème cycle respiratoire. Pourquoi dans certains cas seulement 2 cycles sont nécessaires à l'animal pour qu'il prenne sa décision ? Nous avons mesuré la durée d'inspiration du 1er cycle respiratoire en fonction du nombre de cycles pris par l'animal. Nous avons observé que la Di du 1er cycle est significativement plus grande quand l'animal ne prend que 2 cycles que lorsqu'il en prend au moins 3 (Fig. 37C), et cela quelle que soit la paire examinée. Ce résultat suggère un lien entre l'arrivée des variations des paramètres respiratoires, le nombre de cycles nécessaires à l'animal pour échantillonner et prendre sa décision et la quantité d'information prise lors du 1er cycle respiratoire (liée à la Di).

Finalement, nous avons observé que l'animal pouvait adapter sa façon d'échantillonner de façon globale mais qu'il pouvait également adopter des adaptations cycle à cycle en fonction de certaines odeurs validant l'idée d'un acte olfacto-moteur rapide et contrôlable. Nous avons observé que l'animal flaire de façon équivalente des odeurs proches (P1, P2 et P3). Lorsqu'elles sont différentes, pour deux des paires dissimilaires (P4 et P5), l'animal ne les flaire pas de la même façon, ce qui confirme bien que l'animal fait varier son flairage en fonction de la qualité des odeurs. Pour les deux autres paires dissimilaires (P6 et P7), nous avons observé des variations plus modestes. Cela signifie donc que d'autres éléments rentrent en ligne de compte. Notamment, le « contexte » de l'odeur semble important. Par « contexte », nous définissons, la paire dans laquelle une odeur est présentée.

3.4.2.2.3 Variations des paramètres respiratoires en fonction du « contexte » odorant

Certaines odeurs ont été présentées dans deux paires différentes. C'est le cas pour quatre de nos odeurs : carS présentée dans les paires 2 et 7 ; hept présentée dans les paires 4 et 6, limP présentée dans les paires 3 et 7 et enfin mbz présentée dans les paires 1 et 6. Pour comparer les effets de la même odeur présentée dans deux paires différentes, nous avons utilisé les essais des rats ayant réalisé la tâche avec les deux paires d'odeurs.

Nous avons observé que, pour chacune des odeurs présentées dans deux paires différentes, les paramètres de la respiration variaient de façon significative. Sur la figure 38, sont présentés deux exemples, en A pour la carS et en B pour le hept. Si l'on prend l'exemple de la carS (Fig. 38A), on peut observer des différences significatives au 3ème cycle respiratoire pour la Di et la De. Les animaux respirent la carS avec une Di et une De plus grandes lorsqu'elle est présentée dans la P2 que lorsqu'elle est présentée dans la P7 (respectivement, $t=-3.155$, $p<0.01$; $t=-3.184$, $p<0.01$; Fig. 38A en haut et en bas). Pour l'hept, on observe une différence significative de De au 3ème cycle respiratoire ($t=2.443$, $p<0.05$, Fig. 38B, en bas). Dans ce cas, les animaux prennent une plus grande De lorsque l'hept est présenté avec le mbz dans la P6 qu'avec l'iso dans la P4.

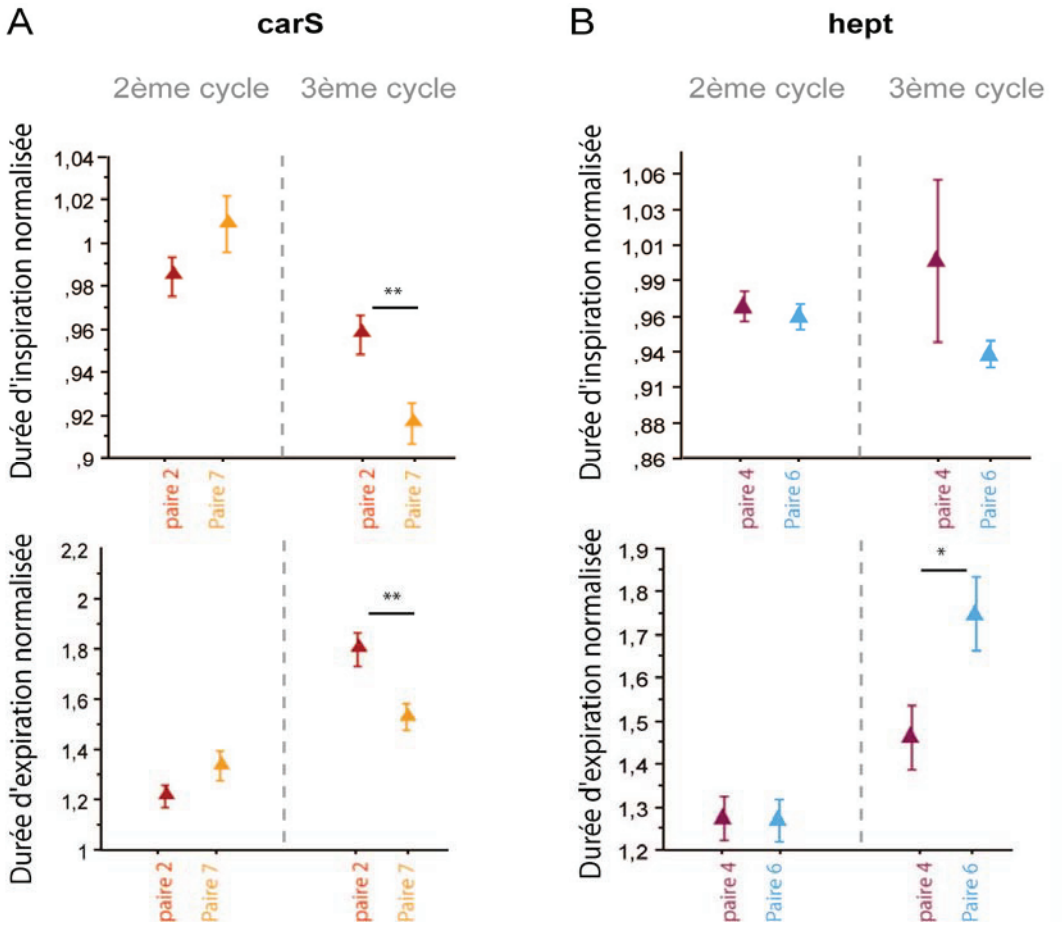


Figure 38 : Selon l'odeur avec laquelle elle est présentée, une odeur induit différents patterns respiratoires. Représentation de chaque paramètre, du bas vers le haut, Di et De mesurées pour une même odeur lorsqu'elle est présentée dans deux paires différentes. Les valeurs sont normalisées comme dans la figure 35. A) L'odeur est la carS présentée soit dans la P2 (rouge) soit dans la P7 (orange). On observe des différences significatives au 3ème cycle pour la Di et la De (respectivement, t=-3.155, p<0.01 ; t=-3.184, p<0.01). B) L'odeur est l'hept présentée soit dans la P4 (rose) soit dans la P6 (cyan). On observe des différences significatives au 3ème cycle uniquement pour la De (t=2.443, p<0.05). Au 2ème cycle respiratoire : P2 n_{carS}=220, P4 n_{hept}=148, P6 n_{hept}=195 et P7 n_{carS}=222 ; Au 3ème cycle respiratoire : n_{carS}=199, P4 n_{hept}=121, P6 n_{hept}=154 et P7 n_{carS}=198. La moyenne est exprimée ± SEM. Statistique : test-t non apparié, p<0.05* ; p<0.01**.

Ainsi un animal peut non seulement adapter sa façon de respirer en fonction de la qualité de l'odeur mais également en fonction du contexte (paire) dans lequel l'odeur est présentée.

La question qui vient ensuite, c'est de savoir si l'ensemble de ces variations sont pertinentes, sont nécessaires pour l'animal, et comment elles évoluent au cours de l'apprentissage.

3.4.2.2.4 Comparaisons des paramètres respiratoires entre le premier jour de présentation des odeurs et le jour test.

Nous avons analysé les données recueillies lors de la première session de présentation des odeurs (J0). Dans ce cas, on a considéré à la fois les essais 'réussite' et les essais 'échecs' puisque la plupart des animaux n'ont pas atteint le seuil de réussite. Cependant, certains rats avaient dès J0, pour certaines paires, atteint le niveau de réussite, leurs essais n'ont alors pas été considérés pour les calculs à J0.

Lorsque l'on prend l'ensemble des essais au premier jour de présentation des odeurs (J0), on observe qu'en majorité les variations de paramètres respiratoires entre odeurs d'une même paire sont similaires à ceux observés lors du jour où les animaux ont atteint le seuil de réussite (Jtest). Certains effets sont atténués entre J0 et Jtest, d'autres apparaissent à Jtest mais de façon globale, les courbes ont les mêmes tendances, comme le montre la figure 39 pour la De au 2ème cycle respiratoire.

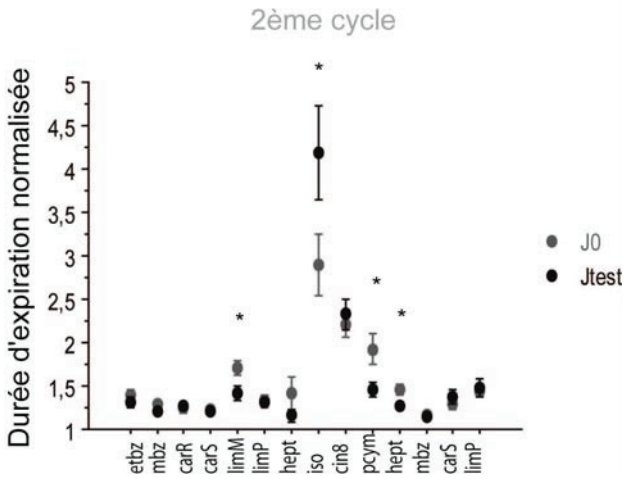


Figure 39 : Comparaison par odeur de la De du 2ème cycle respiratoire lors de la première présentation des odeurs (J0, en gris) et lors de la session réussite (Jtest, en noir). Les paramètres de la De au 2ème n'ont que peu ou pas changé entre J0 et Jtest. Nous avons observé une différence significative pour le limM (P3, t=2.408, p<0,05), pour l'iso (t=-2.086, p<0,05), pour le pcym (t=2.607, p<0,01) et pour l'heptoh (P6, t=2.244, p<0.05). A J0 n au 2ème cycle respiratoire, P1 n_{etbz}=163, n_{mbz}=153, P2 n_{carR}=239, n_{carS}=225, P3 n_{limM}=187, n_{limP}=179, P4 n_{hept}=38, n_{iso}=36, P5 n_{cin8}=85, n_{pcym}=85, P6 n_{hept}=155, n_{mbz}=154 et P7 n_{carS}=142, n_{limP}=159 ; A Jtest au 2ème cycle respiratoire, pour les rats ayant également un J0 : P1 n_{etbz}=201, n_{mbz}=207, P2 n_{carR}=221, n_{carS}=220, P3 n_{limM}=225, n_{limP}=218, P4 n_{hept}=29, n_{iso}=28, P5 n_{cin8}=102, n_{pcym}=116, P6 n_{hept}=195, n_{mbz}=163 et P7 n_{carS}=145, n_{limP}=134. La moyenne est exprimée ± SEM. Statistique : test-t non apparié, p<0.05*, p<0.01 **.

3.4.2.3 Interprétation et discussion

Nous avons posé l'hypothèse qu'un animal pouvait très rapidement moduler sa respiration en fonction de la qualité des molécules odorantes. Si cette hypothèse est vraie, l'animal ne doit que peu ou pas faire varier sa respiration entre odeurs proches et doit la moduler lorsque les odeurs présentées sont dissimilaires. A l'aide d'un dispositif non invasif d'enregistrement de la respiration et d'une tâche comportementale active, nous avons montré que la respiration pouvait être adaptée très rapidement. Comme le prédit notre hypothèse, les paramètres de la respiration ne sont pas grandement affectés lorsque les deux odeurs présentées sont proches. Lorsque les odeurs présentées sont dissimilaires, nous avons observé pour deux des paires dissimilaires, des différences importantes de flairage. En revanche, pour les deux autres paires, ces différences sont plus modestes. Une règle absolue ne peut donc pas se dégager concernant les variations de flairage et le lien avec les propriétés physico-chimiques des molécules odorantes. D'autant que nous montrons également que la respiration s'adapte au contexte odorant, une même odeur peut être flairée de façon différente selon l'odeur avec laquelle elle est présentée dans la tâche.

3.4.2.3.1 Plusieurs cycles respiratoires nécessaires dans nos conditions expérimentales

Nous avons montré qu'en moyenne, les animaux prenaient 3.5 cycles respiratoires lorsqu'ils échantillonnaient l'odeur, avec une présence au port moyenne d'environ 0.5 secondes (Fig. 33). Cela est assez surprenant puisque dans une tâche similaire (Uchida et Mainen, 2003), il a été montré que les animaux pouvaient discriminer deux odeurs en 1 à 2 cycles respiratoires et en environ 0.22 sec (médiane). Pour expliquer cette grande différence, plusieurs hypothèses peuvent être avancées. La première est que les rats de l'étude d'Uchida et Mainen (2003) sont des rats ultra-entrainés : pour les 4 rats, les auteurs ont réalisé environ 34000 essais et ils ont considéré les essais lorsque les animaux atteignaient un pourcentage de réussite supérieur à 90%. Dans notre cas, nous avons utilisé les essais où la réussite était supérieure à 70%. Surentrainer des animaux peut certainement permettre de réduire les temps, d'optimiser les mouvements, c'est aussi ce que proposent Kepecs *et al.* (2006). De plus, les animaux d'Uchida et Mainen réalisent des centaines d'essais par session et la récompense à chaque essai est moins grande que la nôtre (respectivement 20µL et 60µL), ce qui pourrait forcer les rats à aller encore plus vite. Une autre explication non exclusive peut également être avancée. Pour cela, il faut revenir à l'historique de l'expérience présentée dans les résultats. Nous avons entrainé des rats dans la tâche présentée ci-dessus, et ces derniers ont très rapidement appris les règles. Or nous avions commencé la tâche avec une paire d'odeurs très similaires. Avec ces mêmes rats, j'ai inversé la place des odeurs dans l'olfactomètre. Si ces rats avaient bien appris l'indice odeur, ils auraient dû faire un grand pourcentage d'erreurs or cela n'a pas été le cas. En inversant les odeurs, nous avons mis à nu le fait que certains rats n'avaient pas appris l'indice odeur mais l'indice "puff d'air" lié à la valve de l'olfactomètre. Effectivement après différentes vérifications, nous nous sommes aperçues que l'une des valves de l'olfactomètre s'ouvrait de façon plus rapide que l'autre. Nous avons donc modifié l'olfactomètre en nous assurant qu'il n'y avait plus de différence entre les valves. Nous avons également vérifié, pour les animaux suivants, que lorsque nous inversions les odeurs, le pourcentage de réussite chutait dramatiquement. Cette expérience a permis de révéler que dans certaines conditions, les animaux peuvent utiliser d'autres indices que l'odeur pour réussir la tâche. Nous avons comparé le nombre de cycles pris et la durée de présence au port pour la même paire d'odeur présentée dans les conditions avec (indice flux d'air lié à l'ouverture des valves) et sans différence entre les valves. Nous avons observé, que bien que significativement l'effet ne ressorte pas, il existe une tendance où les animaux qui ont pris l'indice puff d'air prennent moins de cycles et restent moins longtemps dans le port à odeur. On ne peut donc pas exclure que dans les expériences d'Uchida et Mainen (2003), les animaux aient pu prendre, au moins en partie, le flux d'air comme un indice pour aller plus vite. Et si c'est le cas, cela signifie que leur tâche est rendue plus facile que la nôtre. Or il a été montré, chez des souris, que lorsque la difficulté de la tâche est augmentée, les animaux ont besoin de rester plus longtemps dans le port à odeur (Abraham *et al.*, 2004). C'est ce que Rinberg *et al.* (2006b) ont appelé le compromis entre exactitude et rapidité de la réponse.

3.4.2.3.2 Rapidité et décours temporel de la modulation de la respiration en fonction des odeurs

Il a été montré qu'un Homme pouvait rapidement adapter son amplitude d'inspiration en fonction de la concentration des molécules odorantes. Effectivement, en utilisant un protocole avec des odeurs à différentes concentrations, Johnson *et al.* (2003) ont montré que l'amplitude d'inspiration était indépendante de la concentration de l'odeur pendant les 150 premières ms suivant l'arrivée de l'odeur et devenait significativement différente à partir de 160 ms. En revanche, à notre connaissance, aucune étude n'a démontré la rapidité de la modulation respiratoire en fonction de la qualité des odeurs. Nous avons montré des variations très rapides des paramètres intrinsèques à la respiration (Di, Ai et De) en fonction de la qualité des molécules odorantes. Effectivement, nous avons observé une faible proportion de variations au 1er cycle suivant l'arrivée de l'odeur et des variations très marquées dès le 2ème cycle respiratoire (Fig. 35). En moyenne, le 1er cycle respiratoire ne dure que 127 ms, cela signifie que les variations se produisant dès le 2ème cycle respiratoire sont extrêmement rapides. Ces variations rapides sont tout à fait cohérentes avec les travaux de Monod *et al.* (1989). Ces auteurs réalisaient des stimulations électriques du BO et enregistraient en parallèle la respiration. Ces auteurs ont observé que la stimulation électrique du BO induisait un changement d'activité respiratoire dans les 45 ms suivant la stimulation. Ce résultat a également été retrouvé par Wesson *et al.* (2008a) qui montrent qu'une nouvelle odeur induit un changement de flairage de l'animal dans les 50 ms suivant l'activation du BO par l'odeur (enregistrée grâce à l'imagerie des terminaisons des neurorécepteurs). Monod *et al.* (1989) ont également réalisé une tâche de discrimination, le rat devait discriminer un stimulus conditionnel correspondant à la stimulation d'une zone spatiale spécifique du BO. Ces auteurs ont noté que lorsque l'animal devait discriminer deux zones stimulées différentes, la latence de changement de flairage était d'environ 140ms. Cette latence correspondrait à une variation lors du 2ème cycle respiratoire comme nous avons pu l'observer. Nous verrons dans la discussion générale, quels circuits peuvent être empruntés pour permettre une modulation si rapide.

De façon très intéressante, nous avons observé que, dans les cas où les animaux ne prennent que 2 cycles respiratoires au lieu de 3 ou plus, il est possible d'observer des modulations dès le 2ème cycle respiratoire (qui n'apparaissent majoritairement qu'au 3ème cycle quand l'animal prend plus de 3 cycles ; Fig. 37B). La modulation arrive donc, dans ce cas, de façon plus précoce. Comment et pourquoi cela est il possible ? Un indice nous a été fourni par la durée de la première inspiration (Fig. 37C). Effectivement, nous avons observé que cette dernière est significativement plus grande lorsque l'animal ne prend que 2 cycles. Et ceci est vrai pour l'ensemble des paires analysées. On peut donc supposer que l'animal a pu rapidement moduler sa respiration parce qu'au 1er cycle respiratoire, il avait eu une quantité suffisante d'information.

3.4.2.3.3 Modulation de la respiration et propriétés physico-chimiques des molécules odorantes : existe-t-il une règle ?

Nous avons montré qu'un animal flairait de façon similaire deux odeurs proches (Fig. 35). Lorsque les odeurs sont proches, elles activent des zones communes de l'EO, le fait que l'animal flaire de la même façon les odeurs signifie que celles-ci se lient probablement aux mêmes récepteurs et possèdent les mêmes affinités molécules-récepteurs. Lorsque les odeurs présentées étaient différentes, nous avons observé d'importantes différences de flairage entre odeurs pour 50% de nos paires (P4 et P5, Fig. 35). On pourrait penser que les différences observées sont uniquement dues à un effet intensité puisque les odeurs de la P4 ont des pressions de vapeur différentes. Mais premièrement, ceci est vrai pour la P4 mais pas pour la P5, composée d'odeurs différentes avec des pressions de vapeur semblables. Deuxièmement, la concentration d'un corps gazeux, ne dépend pas seulement de la pression de vapeur. Par exemple, le méthane qui a une très forte pression de vapeur n'est pas odorant car il a une solubilité trop faible, on ne peut percevoir le méthane qu'en condition hyperbare (Holley et MacLeod, 1977). La pression de vapeur ne peut pas expliquer toutes les différences observées pour les paires 4 et 5. Le paramètre qualité de la molécule a donc bel et bien une influence sur la façon dont un animal va flairer. D'autres paramètres liés aux molécules odorantes peuvent également entrer en jeu et expliquer pourquoi l'on observe si peu de différences entre odeurs des paires 6 et 7. Premièrement, l'animal peut adopter différentes stratégies, il peut dans certaines conditions faire varier sa façon globale d'échantillonner et ne pas faire varier de façon fine son flairage. C'est le cas pour la P6 (Fig. 34). Deuxièmement, on ne connaît pas 1) le nombre de récepteurs se liant à une même odeur, 2) leur façon de se lier au récepteur, leur affinité avec ce dernier et 3) comment chaque molécule est prise en charge par les protéines à l'interface air/mucus. On peut alors proposer que, dans les cas où l'on n'observe pas de différence entre les odeurs d'une même paire, il est probable que les odeurs, de par leur conformation spatiale ou certains de leurs groupements chimiques, aient activés les mêmes récepteurs. Par exemple, il est probable que les récepteurs de l'hept soient aussi sensibles au mbz. Cela va dans le sens des travaux d'Araneda *et al.* (2000) qui montrent qu'un récepteur particulier est sensible à certaines fonctions des molécules odorantes. De plus, récemment Abaffy et DeFazio (2011) ont montré qu'il n'était pas possible de réaliser un simple cluster ou une relation linéaire entre les propriétés physico-chimiques des odeurs et l'expression fonctionnelle des neurorécepteurs des zones dorsales et ventrales de l'EO. Mais ce travail, bien qu'intéressant, a été réalisé *in vitro,* en utilisant des micro-transplantations de membranes des cils dérivées de l'EO et exprimées dans des œufs de xénopes, et ne rend donc pas compte de la dynamique ou de la migration des stimuli. Tant qu'il n'y aura pas de méthode pour déterminer à la fois le nombre et l'affinité des récepteurs *in vivo* pour un panel d'odeurs, ces hypothèses ne pourront être confirmées ou infirmées.

Finalement, nous avons bien montré qu'un animal pouvait adapter sa façon de flairer en fonction des molécules odorantes mais nous ne pouvons dégager de règle absolue entre certaines propriétés physico-chimiques des odeurs et les variations de la respiration. L'espace olfactif est loin d'être métrique et des paramètres, comme l'affinité des récepteurs, ne sont pas encore suffisamment connus. En plus de ces paramètres molécules et interactions molécules-récepteurs, d'autres facteurs, moins moléculaires semblent également jouer un rôle dans la façon de renifler les odeurs.

3.4.2.3.4 Modulation de la respiration et « contexte » dans lequel sont présentées les odeurs

Grâce aux paires 1, 2, 3, 6 et 7, nous avons pu analyser comment les animaux flairaient la même odeur présentée dans deux paires différentes, ce que nous avons appelé, le « contexte de l'odeur ». Nous avons observé qu'en fonction de la paire dans laquelle elle est présentée, une odeur va induire différentes façons de flairer (Fig. 38). Cela veut donc dire que pour une odeur donnée, il n'y a pas un pattern de respiration absolu. Il semblerait que le système fonctionne plutôt dans le relatif et intègre la donnée paire, contexte. La perception des odeurs pourrait alors être comparable à la perception des couleurs qui peut varier en fonction du contexte. Un indice allant en ce sens provient d'une étude de Wesson *et al.* (2008b). Ces auteurs ont enregistré le flairage chez des souris réalisant diverses tâches comportementales : habituation/déshabituation, Go/noGo et une tâche de discrimination simultanée avec deux pots odorisés associés ou non à une récompense. Ces auteurs ont montré que le flairage variait en fonction de la tâche comportementale. Le flairage n'est donc seulement lié aux odeurs mais également de façon plus générale au contexte, à la demande attentionnelle… L'impact du contexte se retrouve également au niveau de l'activité bulbaire. Tout d'abord, Freeman et Viana Di Prisco (1986) ont enregistré le PCL chez le lapin et ont réalisé une tâche dans laquelle une odeur était associée à de l'eau et une autre non associée à une récompense hydrique. Ces auteurs ont montré qu'il était possible de classifier les essais avec et sans eau grâce aux paramètres intrinsèques des oscillations gamma (fréquence et amplitude). De plus lorsque la signification (eau/pas d'eau) d'une même odeur est modifiée, alors les paramètres des oscillations gamma varient (Pour revues : Rojas-Libano et Kay, 2008 ; Kay *et al.*, 2009). Cet impact du contexte sur l'activité du PCL se retrouve également dans l'activité de décharge des cellules M/P. Il a été montré que les cellules M/P chez l'animal vigile codaient non seulement les odeurs mais également le contexte (Kay et Laurent, 1999). Dans cette étude, le contexte correspond au renforcement associé à l'odeur qui peut être positif ou négatif. Lorsque le renforcement associé à l'odeur est modifié, la réponse des cellules M/P à cette même odeur change. Plus récemment, Doucette *et al.* (2011) ont montré que la réponse des cellules M/P à deux odeurs renforcées différemment divergeait environ 250 ms après l'arrivée de l'odeur. Cela signifierait donc que très rapidement après l'arrivée de l'odeur, le BO possède une empreinte du contexte avec lequel l'odeur est associée. Et ce délai de 250ms correspond environ à la durée de 2 cycles respiratoires, ce qui coïncide avec le fait que l'on observe une différence de flairage au 3ème cycle respiratoire pour la même odeur présentée dans deux paires différentes.

Les inputs provenant des centres pourraient modifier l'activité bulbaire en fonction de l'attention, de la motivation, de l'apprentissage, etc. (Gray *et al.*, 1986). Il n'est donc pas impossible que ces mêmes centres agissent également sur les centres respiratoires d'autant que l'on sait que le flairage entretient une relation avec le système de récompense et est lié à l'anticipation (Clarke et Trowill, 1971 ; Ikemoto et Panksepp, 1994 ; Kepecs *et al.*, 2007).

3.4.2.3.5 Perspectives : Est-ce que les variations de paramètres respiratoires permettent d'optimiser la discrimination des odeurs ?

Après avoir montré qu'il existait des variations de paramètres respiratoires qui étaient dépendantes en partie des odeurs mais aussi du contexte, nous nous sommes demandé si ces variations étaient utiles pour la discrimination. Nous avons donc analysé les paramètres au premier jour de présentation des odeurs (J0, Fig. 39). Nous avons montré qu'en majorité, on retrouvait les variations de paramètres respiratoires observées lorsque l'animal était arrivé à un pourcentage de réussite supérieur à 70%. Si ces variations apparaissent de façon précoce, avant même que l'animal ne soit parvenu à un score supérieur à 70%, cela pourrait remettre en doute le fait que les variations de flairage aident à discriminer. Les variations ne permettraient non pas d'optimiser le dépôt des odeurs pour mieux discriminer mais seraient plus simplement liées au phénomène de perception des odeurs. Mais il me semble qu'une telle conclusion ne peut pas être tirée de ces données car J0 n'est probablement pas un jour "contrôle" satisfaisant. Effectivement, J0 est bien le jour de la première présentation des odeurs mais les rats connaissaient déjà la règle, c'est-à-dire ils savent déjà qu'il faut discriminer deux odeurs. De plus, J0 est un jour très hétérogène, en terme de score de réussite, à la fois entre rats et pour un même rat en fonction des paires. Par exemple, pour une même paire, certains rats à J0 ont un score très bas, d'autres ont un score élevé bien qu'inférieur à 70%. Et cela est également dépendant des paires d'odeurs utilisées. Par conséquent, J0 ne nous fournit pas suffisamment d'informations pour répondre à la question : est ce que les variations de flairage sont utiles, nécessaires pour discriminer les odeurs.

Si ces variations sont utiles quand l'animal doit discriminer, alors elles ne devraient pas être présentes lorsque l'animal ne doit pas discriminer les odeurs. Il faudrait donc utiliser un autre test comportemental, dans lequel toutes nos odeurs seraient présentées, et toujours récompensées pour être dans les mêmes conditions que notre test, mais il faudrait que l'animal n'ait pas à les discriminer. Nous pourrions, par exemple, adapter la tâche de Cury et Uchida (2010) dans laquelle les animaux doivent mettre leur nez dans un port et ont toujours une récompense quelle que soit l'odeur. Les animaux dans cette tâche n'ont donc pas besoin de discriminer les odeurs. Ainsi, si l'on n'observe pas de différence de flairage entre odeurs lorsque l'on réalise ce test, cela sera un argument en faveur de l'importance des variations de flairage pour la discrimination.

Table Supplémentaire 1 : Nombre d'essais dans chacune des conditions. Ce nombre d'essais est valable pour les figures 34 et 35.

	Nombre d'essais	Nombre total	1er cycle	2ème cycle	3ème cycle
P1	etbz	213	213	201	178
	mbz	220	220	207	192
P2	carR	227	227	221	195
	carS	226	226	220	199
P3	limM	237	237	225	177
	limP	232	232	218	172
P4	hept	155	155	148	121
	iso	157	157	137	65
P5	cin8	115	115	102	51
	pcym	127	127	116	75
P6	hept	205	205	195	154
	mbz	168	168	163	144
P7	carS	232	232	222	198
	limP	208	208	204	168

4 DISCUSSION GENERALE

L'activité du système olfactif est imprégnée par le rythme respiratoire. Or la respiration est un acte très dynamique. Ces variations de respiration ont un impact sur l'activité de l'EO. Dans une première partie de ma thèse, nous avons souhaité savoir si ces modifications se retrouvaient également au niveau de l'activité du BO. Dans une seconde partie de ma thèse, nous avons souhaité caractériser l'importance fonctionnelle des variations de respiration pour le système olfactif.

Dans les études 1 et 2, nous montrons 1) que l'activité du BO est sensible au flux d'air désodorisé, 2) que la représentation d'une odeur au niveau bulbaire est modifiée en fonction du débit et de la fréquence respiratoire. Ces modifications s'expriment tant au niveau de l'apparition des oscillations rapides du PCL qu'au niveau de la décharge des cellules M/P, et 3) que le système olfactif peut garder une forte rythmicité respiratoire en augmentant le débit respiratoire lorsque la fréquence respiratoire est élevée. Et cette stratégie respiratoire (augmentation conjointe du débit et de la fréquence respiratoire) peut effectivement être utilisée par les animaux vigiles.
Dans une dernière partie de ma thèse, nous souhaitions tester le rôle fonctionnel des variations de respiration chez l'animal qui se comporte. L'hypothèse que nous posions était la suivante : le flairage fait partie de l'acte olfacto-moteur et, plus précisément, des variations de la respiration favorisent la déposition des molécules odorantes le long de l'EO. Nous avons mis au point une expérience de comportement couplée à l'enregistrement de la respiration. Nous montrons que le flairage varie non seulement en fonction de la qualité des molécules odorantes mais également en fonction du contexte dans lequel les odeurs sont présentées.

Nous allons discuter de l'ensemble de ces résultats en évoquant des points qui n'ont pas été abordés dans les discussions spécifiques à chacune des études.

4.1 Considérations méthodologiques

4.1.1 Le modèle anesthésié

Dans la première partie de ma thèse, nous avons réalisé des études chez l'animal anesthésié. Certains auteurs critiquent l'utilisation de ce modèle. Effectivement, les activités électrophysiologiques du BO sont différentes chez un animal anesthésié et chez un animal vigile. Le taux de réponse aux odeurs des cellules M/P est plus élevé chez un animal anesthésié que chez un animal vigile (Rinberg *et al.*, 2006a). L'expression des activités oscillatoires est elle aussi différente. Chez l'animal anesthésié (à l'uréthane), les rythmes beta et gamma alternent au cours d'un cycle respiratoire (Buonviso *et al.*, 2003) et il n'est possible d'observer ces rythmes rapides que lors d'une stimulation odorante. Chez un animal vigile, on retrouve des oscillations gamma de façon spontanée, en l'absence d'odeur (Martin *et al.*, 2004) et l'expression des rythmes en réponse aux odeurs est dépendante de la tâche (Ravel *et al.*, 2003 ; Martin *et al.*, 2006 ; Chapuis *et al.,* 2009).

Pour comprendre l'utilité du modèle anesthésié dans la première partie de ma thèse, il faut revenir à notre problématique. Nous souhaitions savoir si les variations de dynamique respiratoire pouvaient avoir une influence sur l'activité bulbaire. Notre but étant d'étudier l'effet de la périphérie vers les centres (bottum-up), l'animal anesthésié représentait donc le meilleur modèle d'étude. D'une part, parce que nous souhaitions être sûres que les effets observés provenaient bien de la périphérie, il nous fallait alors un modèle dans lequel les retours corticaux sur le bulbe étaient diminués. D'autre part, nous souhaitions contrôler précisément et indépendamment la fréquence et le débit respiratoire. Or on ne peut pas demander à un animal de respirer de telle ou telle façon. Il fallait donc que l'on réalise une double-trachéotomie afin d'avoir un contrôle total sur l'air passant dans la cavité nasale.

L'interprétation des résultats obtenus chez des animaux anesthésiés ne peuvent, bien sûr, pas directement être transposés à ce qui pourrait se passer chez l'animal vigile. Cependant, les données obtenues chez l'anesthésié nous permettent de voir ce que le système olfactif est capable de faire sous certaines conditions de flairage.

4.1.2 L'enregistrement de la respiration

De nombreux auteurs enregistrent la respiration chez l'animal vigile avec des canules implantées dans la cavité nasale (Uchida et Mainen, 2003 ; Shusterman *et al.*, 2011, Smear *et al.*, 2011). Nous avons choisi d'enregistrer la respiration, de façon non invasive, avec un pléthysmographe corps entier. Dans certains congrès, l'un de ces auteurs nous a reproché d'utiliser ce système en argumentant que ce

n'était pas un moyen fiable d'enregistrer la respiration. Selon lui, le pléthysmographe filtrerait et lisserait le signal lorsque ce dernier est à haute fréquence. Premièrement, nous avons réalisé des pré-tests en enregistrant en parallèle le signal respiratoire d'un animal anesthésié avec le pléthysmographe et avec un capteur de débit. Les signaux enregistrés étaient identiques. Ensuite, le problème du lissage du signal à haute fréquence n'en est pas un puisqu'à haute fréquence, il n'y a plus de plateau d'expiration. Enfin, et de façon encore plus importante, je pense qu'il faut se replacer dans un contexte plus écologique. Notre intérêt est la respiration, par conséquent, il nous faut un moyen de mesure qui ne détériore pas ce signal de façon basale. Déjà Teichner (1966) soulevait le point que d'enregistrer la respiration avec des canules intra-nasales pouvait restreindre la respiration elle-même. De plus, la gêne imposée par une canule implantée dans la cavité nasale peut agir comme un stimulus émotionnel or tout élément de stress peut modifier la respiration (Alberts et May, 1980 ; Dauger *et al.*, 1998 ; Hegoburu *et al.* ,2011). Les canules intra-nasales peuvent représenter un élément de stress puisque leur implantation est rendue délicate de par la forte irrigation sanguine de la cavité nasale et parce que le moindre mouvement de la canule peut provoquer une hémorragie. De plus, les canules implantées n'enregistrent le flux d'air que dans la région de la cavité nasale sur laquelle elles débouchent. Or il est possible que le signal enregistré à cet endroit n'évolue pas de la même façon dans les autres zones de la cavité nasale (Neuhaus, 1981). Ce signal pourrait donc ne pas représenter la stratégie globale du rat mais seulement ce qui se passe dans une zone restreinte de la cavité nasale. Dans ce contexte, et après en avoir débattu avec des spécialistes de la respiration (communications personnelles avec le Dr. Gallego Jorge), il apparait qu'une méthode totalement non invasive, comme le pléthysmographe corps entier, est le meilleur compromis pour étudier les variations de respiration.

4.2 La rythmicité respiratoire dans le système olfactif

Une rythmicité respiratoire évidente s'exprime dans le système olfactif en réponse aux odeurs. Il est intéressant de noter que cette rythmicité persiste en l'absence d'odeur. La question de l'origine d'un tel rythme se pose alors. Nous allons voir dans une première partie, quelles peuvent être les origines de ce rythme, en l'absence d'odeur, en nous basant à la fois sur les résultats obtenus au cours de ma thèse et sur la littérature (la figure 40 reprend les différentes origines possibles). Nous verrons ensuite comment le système olfactif peut utiliser la modulation respiratoire. Enfin nous verrons si l'on peut retrouver un rythme analogue chez les espèces ne présentant pas de respiration pulmonaire.

4.2.1 Les différentes origines possibles

Nous avons considéré et détaillé trois origines possibles pour le rythme respiratoire : une périphérique, une centrale et une intrinsèque au BO.

4.2.1.1 Origine périphérique: mécanosensibilité

Dans la première partie de l'étude 1, nous avons montré que lorsque l'air ne circule plus dans la cavité nasale le rythme lent du PCL disparait et la population de cellules sensibles à l'air (27% des cellules) ne présente en majorité plus d'activité. Ceci est en accord avec les résultats de différentes études montrant que le rythme lent du PCL (Adrian, 1938, 1942 ; Gray et Skinner, 1988b), l'activité de décharge (Macrides et Chorover, 1972 ; Onoda et Mori, 1980 ; Philpot *et al.*, 1997) et les oscillations du potentiel de membrane (Phillips *et al.*, 2012) des cellules M/P en relation avec la respiration sont abolis lorsque l'air ne circule pas dans la cavité nasale. Nous avons observé que lorsque l'air re-circule dans la cavité nasale, la rythmicité respiratoire du PCL réapparait et les cellules sensibles à l'air présentent en majorité un pattern synchronisé à la respiration. La circulation périodique de l'air dans la cavité nasale permet donc la genèse au niveau du PCL de la modulation respiratoire et permet à certaines cellules de décharger de façon rythmée à la respiration. Cette rythmicité respiratoire a probablement pour support en grande partie la mécano-sensibilité des neurorécepteurs olfactifs (Grosmaitre *et al.,* 2007). Mais pourquoi les cellules mitrales n'ont-elles pas toutes une sensibilité à l'air? Une première raison vient probablement du fait que seulement 49% des neurorécepteurs de l'épithélium principal présentent une mécanosensibilité (Grosmaître *et al.*, 2007). Cela est aussi confirmé par le fait que Carey *et al.* (2009) ont observé, en imageant les terminaisons des neurorécepteurs au niveau du BO dorsal, que seulement 50% des glomérules présentaient une activité rythmée par

la respiration en l'absence d'odeur. D'autre part, du fait de la complexité des replis de la cavité nasale, l'ensemble de l'épithélium olfactif n'est pas au contact de l'air de façon homogène (Yang *et al.,* 2007). A cause de l'organisation des projections épithélio-bulbaires, une partie seulement des cellules mitrales sera connectée à des glomérules recevant des neurorécepteurs mécanosensibles et/ou situés dans des replis de l'épithélium plus facilement accessibles à l'air. Cela peut également expliquer pourquoi le pattern spontané des cellules M/P (en l'absence d'odeur) est influencé par des variations de débit respiratoire.
Plus généralement, la « mise sous tension » d'une partie des cellules du BO par la mécanosensibilité pourrait le préparer à recevoir l'information odorante, c'est-à-dire maintenir une excitation synaptique dans le réseau bulbaire capable de traiter les inputs sensoriels périodiques.

A côté des cellules sensibles à l'air, nous avons également observé une population de cellules insensibles à l'air. Dans l'article, nous n'avons pas présenté les patterns de décharge de ces cellules. Mais il semble intéressant d'en discuter dans cette partie. Effectivement, que ce soit en présence ou en l'absence d'air, les cellules insensibles à l'air présentent en majorité des patterns non synchronisé à la respiration et nul (ne présentant que peu ou pas d'activité). Ces deux patterns représentent 91% de leur activité de décharge. Or il reste 9% des patterns de décharge (soit 3 cellules sur les 33 de la catégorie des cellules insensibles à l'air) qui restent synchronisés à la respiration. Même si l'origine périphérique de la rythmicité respiratoire semble majoritaire, puisque nécessaire pour la persistance de la modulation respiratoire du PCL, l'observation qu'un très faible pourcentage de cellules puisse présenter une rythmicité respiratoire lorsque l'air ne circule pas dans la cavité nasale, montre que d'autres origines sont possibles. Tout d'abord, une origine centrale peut être avancée (nous l'avons rapidement énoncée dans la partie 1.3.2).

4.2.1.2 Origine centrale

Une origine centrale à la modulation respiratoire a été proposée par Pager et Ravel qui ont enregistré l'activité des cellules M/P chez le rat anesthésié et trachéotomisé. Ces auteurs (Ravel *et al.*, 1987) montrent que lorsque l'air ne circule pas dans la cavité nasale, 37.5 % des cellules M/P enregistrées (30 cellules sur 80 enregistrées) ont un pattern respiratoire qui persiste. Cela est largement supérieur à ce que nous avons observé. Je propose que l'on puisse expliquer cette différence avec deux principaux facteurs. Le premier est l'anesthésique utilisé, dans notre cas de l'uréthane et dans l'autre de l'équithésine. Or, il est connu que les anesthésiques peuvent avoir différents effets dépresseurs sur l'activité du système nerveux central. Par exemple, Tsuno *et al.* (2008) montre que l'uréthane diminue la modulation cholinergique que reçoit le BO. On peut proposer que dans notre cas, l'uréthane a un plus fort effet dépresseur que l'équithésine, c'est aussi ce que suggère Griff *et al.* (2008). Le deuxième facteur pouvant expliquer la différence de

résultat, notamment pour l'étude de Ravel et Pager (1990), est la différence de méthode dans la trachéotomie. Dans notre cas, la trachée est complètement incisée et deux tubes sont utilisés, l'un allant vers les poumons, et l'autre dans la cavité nasale. Ces deux tubes sont indépendants, ce qui n'est pas le cas dans Ravel et Pager (1990). Les auteurs ont réalisé une trachéotomie réversible et il est donc possible qu'une partie du flux d'air pulmonaire soit passée dans la cavité nasale. Il est évident que ceci n'est qu'une supposition et ne remet pas en cause l'intégrité des résultats (la possibilité que certaines cellules M/P possèdent un pattern respiratoire en l'absence d'air dans la cavité nasale) mais peut expliquer le fort pourcentage de patterns respiratoires retrouvé par ces auteurs lorsque l'air ne circule pas dans la cavité nasale.

Ravel et Pager ont proposé que la persistance du rythme respiratoire, lorsque l'air ne circule pas dans la cavité nasale, provienne des aires respiratoires (noyau médial parabrachial) se projetant sur le BO via le noyau pré-optique magno-cellulaire. A l'heure actuelle, on ne connait toujours pas les voies centrales respiratoires pouvant se projeter (indirectement) sur le BO, et cela représente donc une piste de recherche intéressante. Une des premières approches pour déterminer ces voies de projection pourrait être l'utilisation de virus transynaptiques injectés dans le noyau médial parabrachial (Watabe-Uchida *et al.*, 2012).

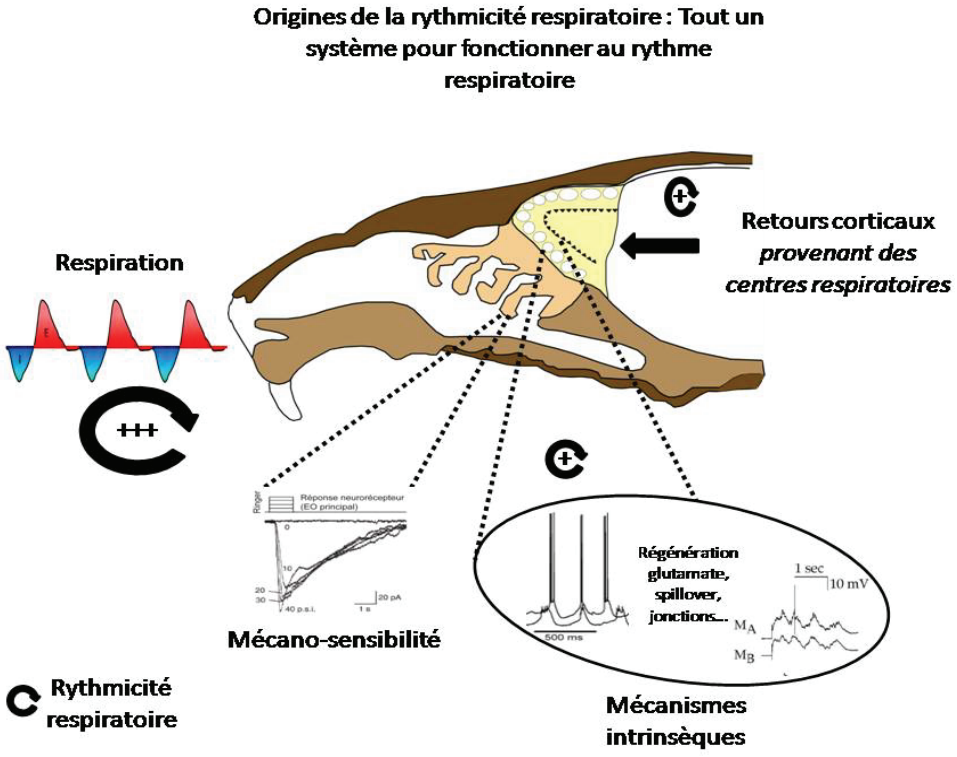


Figure 40 Schéma représentant l'ensemble des mécanismes permettant au système olfactif de fonctionner au rythme respiratoire. De la gauche vers la droite : l'impact de la respiration, la mécanosensibilité, les mécanismes intrinsèques (comprenant la regénération du glutamate, le spillover glutamatergique, les jonctions serrées entre cellules, les différentes connexions glomérulaires et latérales du BO) et l'influence des retours corticaux. Les flèches circulaires représentent un poids relatif que j'ai attribué à chacune de ces origines.

4.2.1.3 Origine intrinsèque

Les origines centrales et périphériques de la rythmicité respiratoire n'excluent pas non plus une origine intrinsèque au BO. L'exemple le plus marquant de ces rythmicités intrinsèques est celui des cellules P externes. Hayar *et al.* (2004 a, b) ont montré que des cellules P externes, enregistrées *in vitro*, déchargent avec des salves de potentiels d'action de façon rythmique et dans la bande de la fréquence respiratoire d'un animal anesthésié (de 2 à 4Hz). Tout un ensemble de courants permettraient la genèse de cette activité rythmée, notamment le courant INa persistant actif au potentiel de repos de la membrane ou encore le courant Ih (Hayar *et al.*, 2004b). Comme ces auteurs, je ne pense pas que ces activités intrinsèques permettent la genèse des rythmes respiratoires *in vivo*, mais je pense qu'elles les amplifient, les facilitent. Cet entretien du rythme respiratoire peut également être porté par des mécanismes intrinsèques au glomérule. Effectivement Schoppa et Westbrook (2001) ont montré sur des tranches de BO, qu'il était possible d'enregistrer des oscillations lentes, dans la bande de la fréquence respiratoire, au niveau du potentiel de membrane des cellules M. Ces auteurs proposent que cette activité repose sur la régénération du glutamate au niveau glomérulaire dont l'ordre de grandeur temporel est d'environ quelques centaines de ms (soit en terme fréquentiel de 1 à 4Hz). De plus, le réseau glomérulaire, *via* différents mécanismes tel que le spillover glutamatergique ou encore les jonctions entre cellules, permet de synchroniser les cellules appartenant au même glomérule (Buonviso *et al.*, 1992 ; Schoppa et Westbrook, 2001 ; Hayar *et al.*, 2005 ; Dhawale *et al.*, 2010, Borisovska *et al.*, 2011). Enfin parce que le réseau bulbaire est doté d'une importante composante d'interactions latérales, les activités rythmées de certaines cellules M/P peuvent influencer les voisines et permettre à un ensemble de cellules de posséder une activité rythmée par la respiration.

Que l'activité rythmée provienne du flux d'air nasal, des retours centraux ou encore soit intrinsèque au BO, ce dont on peut être sûr est que tout le système olfactif est finalement fait pour « travailler, tourner » au rythme respiratoire (Fig. 40). Cela soulève donc une autre question : Est ce que le système peut profiter de la présence de ce rythme et si oui comment peut-t-il l'utiliser ?

4.2.2 Rôle(s) du rythme respiratoire pour le système olfactif

L'importance du rythme respiratoire dans l'activité bulbaire réside dans le fait qu'il va 1) contrôler la sortie du message bulbaire en contraignant à la fois l'activité du réseau, de décharge et sous liminaire des cellules M/P et 2) être dans une bande de fréquence chevauchante de celle de l'oscillation thêta.

4.2.2.1 Cadre temporel

Dans le système olfactif des mammifères, la respiration offre une source naturelle pour le codage temporel. En fournissant ce cadre aux activités bulbaires, la respiration module la sortie du message bulbaire et offre une fenêtre de lecture temporelle pour le décodage du message bulbaire par les aires suivantes. Effectivement, la respiration 1) cadence la décharge des cellules M/P, 2) conditionne l'occurrence d'oscillations rapides (beta et gamma) à des moments spécifiques du cycle respiratoire et 3) conditionne le phasage des potentiels d'actions des cellules M/P avec les oscillations rapides. Ce dernier point est important puisque de façon générale, il a été proposé que la phase de décharge des potentiels d'action par rapport aux oscillations du PCL puisse être utilisée comme un code (Gray et Singer, 1989). Cenier *et al.* (2009) ont montré que les potentiels d'action des cellules M/P avec un pattern de décharge S+ se phasent aux oscillations gamma, ceux des cellules déchargeant avec un pattern S- se phasent aux oscillations beta. Cela signifie donc qu'au cours d'un cycle respiratoire, deux assemblées de neurones alternent. Une hypothèse formulée par l'équipe est que ces deux assemblées auraient des fonctions distinctes. L'assemblée « gamma » serait impliquée dans le transfert des informations au cortex lors de l'inspiration. Cela est tout à fait cohérent avec les données de Luna et Schoppa (2008) montrant que le cortex piriforme possède une fenêtre d'intégration qui correspond à des inputs dans la bande de fréquence gamma. Les assemblées beta seraient impliquées dans les processus plus cognitifs faisant intervenir les rétrocontrôles corticaux lors de l'expiration (Buonviso *et al.*, 2006 ; Cenier *et al.*, 2009). Le fait que les variations de respiration modifient la décharge des cellules, l'occurrence des oscillations beta et gamma et le phasage des potentiels d'action sur les oscillations rapides pourrait donc permettre au réseau bulbaire de fonctionner avec des assemblées de neurones spécifiques. Par exemple, certaines conditions de flairage vont favoriser l'émergence des assemblées gamma et si l'hypothèse de notre équipe est vraie, alors ces conditions favoriseraient le transfert de l'information vers le cortex piriforme. Au contraire, d'autres conditions de flairage favorisant l'émergence des assemblées beta pourraient permettre un échange avec des centres supérieurs autres que le cortex piriforme (Cenier *et al.* 2009)

4.2.2.2 Base de communication entre différentes aires cérébrales ?

Un des rythmes les plus proéminents du cerveau de mammifère est le rythme thêta hippocampique (6-12Hz). La modulation respiratoire du BO occupe une plage de fréquence qui chevauche celle de l'oscillation thêta. Il a alors été proposé que cette bande de fréquence commune puisse être utilisée comme un support efficace de communication entre aires éloignées. Cette partie sera exposée en détail dans la partie acte olfacto-moteur (4.4.3.1).

4.2.3 Existe-t-il un analogue du rythme respiratoire chez les espèces qui n'ont pas de respiration pulmonaire ?

La respiration est un paramètre indissociable de l'activité du système olfactif chez les mammifères. Le rythme respiratoire semble être important pour le codage des odeurs et être un excellent candidat pour la communication entre différentes aires cérébrales. Si ce rythme revêt une telle importance chez les mammifères, comment est-ce que le système olfactif des animaux ne possédant pas de respiration pulmonaire fonctionne t-il et est-il possible de trouver une analogie au rythme respiratoire? Ces questions sont importantes puisqu'une des caractéristiques de l'organisation du système olfactif est d'être conservée au sein de différents phylum. Cette conservation se retrouve tant au niveau de l'organisation anatomique globale du système olfactif, que dans les processus de transduction du signal (Pour revue, Ache et Young, 2005). Par la suite, je vais principalement m'intéresser au système olfactif des insectes. Chez les insectes, la structure analogue au BO est le lobe antennaire (composé de cellules relais et d'interneurones locaux) et celle du cortex piriforme est le corps pédonculé[5] (notamment composé des cellules de Kenyon).

Au niveau du codage des odeurs, chez les insectes, on peut proposer l'existence de deux schémas : soit le système olfactif des insectes utilise des cadres temporels non liés au mode d'échantillonnage soit le système olfactif des insectes a un échantillonnage analogue à celui de la respiration pour les mammifères. Il a été démontré par Laurent et Davidowitz (1994) que le système olfactif des insectes se sert effectivement de dynamiques temporelles intrinsèques, qui ne sont pas liées à la dynamique d'échantillonnage, pour coder les odeurs (relation entre la décharge des cellules relais du lobe antennaire et les oscillations du PCL du corps pédonculé ; Pour revue, Laurent *et al.*, 2001 ; Laurent, 2002 ; Gupta et Stopfer, 2011). Mais il existe différentes études qui montrent qu'en plus de ces cadres temporels intrinsèques, le système olfactif des insectes utilise également des données liées au mode d'échantillonnage. Différents auteurs ont noté que l'échantillonnage du stimulus olfactif par les insectes n'est pas statique. Effectivement, non seulement l'animal se déplace dans la plume odorante mais ses battements d'ailes ont une influence sur la dynamique du stimulus odorant (Loudon et Koehl, 2000; Sane et Jacobson, 2006). L'influence de ces battements d'ailes sur l'activité du système olfactif d'insecte a d'ailleurs récemment été étudiée par Tripathy *et al.* (2010). Ces auteurs ont enregistré les activités unitaires et du PCL des antennes et du lobe antennaire chez le papillon de nuit lorsque les odeurs étaient pulsées à différentes fréquences (dans la bande de fréquence des battements d'ailes : entre 10 et 72Hz). Ces auteurs montrent que les activités des deux structures peuvent suivre la fréquence des odeurs pulsées jusqu'à

[5] *Il est à noter qu'il n'y a pas de lien au niveau de l'évolution entre cortex piriforme et corps pédonculé mais que ce dernier est analogue au cortex piriforme car c'est le relais de l'information provenant du lobe antennaire.*

30Hz. Ceci peut être comparable à ce que l'on voit chez le mammifère, où le système olfactif peut suivre le flairage jusqu'à des fréquences atteignant les 10Hz. De plus, ces auteurs montrent que les seuils de détection des papillons de nuit sont diminués lorsque l'odeur est pulsée autour d'une fréquence avoisinant les 20Hz. Ces données suggèrent que la fréquence d'arrivée de l'entrée sensorielle, qui peut être déterminée par les battements d'ailes, est importante pour le codage et la perception des odeurs. Les battements d'ailes pourraient donc être l'analogue du flairage chez les insectes. Plus généralement, comme l'a proposé Koehl (2006), les battements d'ailes chez les insectes, les mouvements des branchies et de la bouche chez les poissons et les mouvements d'antennes chez les crustacés pourraient être considérés comme les analogues du flairage chez les mammifères terrestres.

4.3 Aparté sur l'invariant de l'odeur

Dans nos deux premières études, nous avons montré que la représentation d'une odeur au niveau bulbaire varie en fonction des variations de respiration. Nous avons montré que des variations de débit et de fréquence modifient le pattern de décharge des cellules M/P, l'apparition des oscillations rapides ainsi que le phasage entre potentiels d'action et oscillations rapides, et ce en réponse à une même odeur. Alors comment, malgré toutes ces modifications, le système reconnaît-il la même odeur? Quel est l'invariant de l'odeur?

On peut faire un parallèle avec le système visuel. La perception visuelle n'est pas possible si l'œil est complètement immobile. Les yeux sont en mouvements constants, l'image rétinienne peut être différente et pourtant nous percevons toujours la même image. Cela implique que des processus puissent intégrer les différents changements liés à l'oculomotricité et les associer afin d'en avoir une image stable. Il faut donc que le cerveau parvienne à extraire les caractéristiques invariables des objets d'un flot d'informations diverses qui proviennent de ces objets et changent perpétuellement. Plusieurs possibilités s'offrent au système pour que la perception de l'odeur reste invariante. Premièrement, l'invariant de l'odeur peut être contenu dans l'information provenant du BO et porté par un élément que nous n'avons pas examiné. Par exemple, Cury et Uchida (2010) ont montré que la première portion de réponse des cellules M/P (les 100 premières ms) était indépendante du rythme du flairage. Au sein de l'équipe, l'un des projets à venir est de déterminer dans nos signaux quel peut être l'invariant de l'odeur en se basant sur les théories de l'information. Deuxièmement, comme l'ont proposé Teghtsoonian et ses collègues, l'information contenue dans un cycle respiratoire pourrait être combinée à l'information sur la façon de flairer les odeurs afin d'en produire un invariant (Teghtsoonian *et al.*, 1978 ; Teghsoonian et Teghtsoonian, 1982). On peut donc imaginer l'existence d'une aire cérébrale qui intégrerait les informations provenant de la périphérie et la façon dont l'animal a flairé, et pourrait alors reconstruire l'invariant de l'odeur. Il faudrait donc pour cela qu'une aire cérébrale reçoive une copie de l'efférence motrice. C'est-à-dire en même temps qu'un ordre moteur serait adressé aux muscles contrôlant la respiration, une copie de cette commande motrice serait adressée vers les centres olfactifs. Pour démontrer cela, il faudrait tout d'abord trouver la structure qui intègre ces informations et ensuite ou dans le même temps déterminer les voies empruntées par la copie de l'efférence motrice. Plus généralement, il devient primordial de déterminer les circuits anatomiques contrôlant la respiration et qui sont en lien avec les structures olfactives.

4.4 L'acte olfacto-moteur

Nous allons tout d'abord voir les preuves de l'existence d'un circuit olfacto-moteur. Ensuite, nous verrons quelles peuvent être les structures et voies candidates pour un contrôle fin et rapide de la respiration et comment ces différentes structures peuvent communiquer entre elles. Nous discuterons des perspectives de travail qui vont en ce sens. Enfin, nous reviendrons, en nous basant sur les résultats de l'étude 3, sur les possibles rôles de cet acte olfacto-moteur.

4.4.1 Les preuves de l'existence d'un circuit olfacto-moteur

L'acte olfacto-moteur peut être défini comme une modulation par le système olfactif de l'activité de flairage. Différents auteurs ont montré que la présentation d'une odeur peut activer le flairage (Welker, 1964 ; Alberts et May, 1980). Cette activation est extrêmement rapide puisqu'elle intervient dans les 50 ms suivant l'activation du BO par l'odeur (Wesson *et al.,* 2008 a,b). De la même façon, Monod *et al.* (1989) ont montré que 45ms après la stimulation électrique du BO, la respiration est modifiée. De façon importante, la respiration est également adaptée en fonction du stimulus odorant : de sa concentration (Youngentob *et al.,* 1987 ; Johnson *et al.,* 2003), de son hédonicité (Bensafi *et al.*, 2003) et de sa qualité (résultats étude 3). Johnson *et al.* (2003) ont démontré que l'adaptation à la concentration pouvait être très rapide (160ms) et nous démontrons également que l'adaptation à la qualité du stimulus se fait dès le 2ème cycle respiratoire suivant l'odeur, soit en moyenne en 127ms. Cette modulation de la respiration par le système olfactif nécessite donc un circuit olfacto-moteur. Nous définissons le circuit olfacto-moteur comme les voies utilisées pour le contrôle du flairage par le système olfactif. Du Pont (1987) a été l'un des premiers et l'un des seuls à démontrer l'influence du système olfactif sur l'activité des centres respiratoires. Chez le lapin vigile contraint, Du Pont (1987) a enregistré l'activité de neurones dans les centres respiratoires situés dans le tronc cérébral. Cet auteur a noté que la présentation d'un coton imbibé d'acétate d'isoamyl induisait un comportement de flairage s'accompagnant d'une modification de la décharge des neurones respiratoires. Cette étude met donc en évidence que le système olfactif peut agir sur la décharge des neurones impliqués dans le contrôle de la respiration. Dans le paragraphe qui suit, nous allons voir par quelles voies anatomiques ce contrôle peut se faire.

4.4.2 Les voies anatomiques possibles

La respiration est un acte particulier puisqu'elle fait partie du système végétatif mais peut également être contrôlée volontairement. On ne discutera pas du contrôle réflexe de la

respiration qui est gouverné par la sensibilité des chemo-récepteurs au potentiel hydrogène et au dioxyde de carbone dans le sang (Gallego *et al.*, 2001). La genèse du rythme respiratoire provient des structures ponto-medullaires et notamment du complexe de pré-botzinger (Pour revue, Ramirez et Richter, 1996). A côté de ce centre générateur, on retrouve également des noyaux qui peuvent moduler la respiration. C'est le cas notamment du noyau du raphé obscur. Effectivement, lorsque l'activité des neurones de ce noyau est modifiée, on peut observer une modulation à la fois de la fréquence et de l'amplitude du signal respiratoire (DePuy *et al.*, 2011). Le noyau du raphé obscur se projette directement sur les motoneurones et la moelle épinière mais également sur le complexe de pré-botzinger. Il est plus probable et plus fiable pour le système que le circuit olfacto-moteur agisse sur les centres respiratoires modulateurs plutôt que générateurs, c'est également ce que suppose Du Pont (1987). Avec l'appui de la littérature, nous allons décrire les circuits par lesquels le système olfactif peut moduler la respiration : le(s) circuit(s) olfacto-moteur. Le circuit olfacto-moteur se doit d'être compatible avec une adaptation très rapide de la respiration. Les voies que je vais exposer font intervenir entre 4 et 5 synapses. Elles sont donc plus ou moins équivalentes en termes de temps de transduction de l'information. Je décrirai 5 possibilités de voies (schématisées sur la figure 41), celles que j'ai considérées comme les plus probables. Cette liste n'est pas exhaustive et n'exclut évidemment pas d'autres possibilités.

Sur les 5 voies que j'ai répertoriées, 3 passeraient par l'hippocampe. Nous allons débuter par ces 3 voies, car, historiquement l'hippocampe a été l'une des premières structures à être suggérée comme faisant partie du circuit olfacto-moteur (Vanderwolf, 1969 ; Macrides *et al.,* 1982). Cela est dû à ses relations/positions stratégiques avec le système olfactif et le système respiratoire. Premièrement, au niveau anatomique, le BO se projette sur l'hippocampe *via* le cortex entorhinal. Fonctionnellement, l'hippocampe peut répondre très rapidement à des stimulations odorantes. Effectivement, en réponse à une stimulation électrique du BO, Vanderwolf (1992) a enregistré un potentiel évoqué dans l'hippocampe dont la latence est inférieure à 16ms. Deuxièmement, l'hippocampe entretient des relations avec la respiration. Tout d'abord, la stimulation de l'hippocampe ventral induit une modulation de la respiration (Duffin et Hockman, 1972). Ensuite, on peut observer des relations entre l'activité hippocampique et la respiration (Pour revue, Harper *et al.* 1998). De plus, chez des patients épileptiques, dont les neurones hippocampiques ont pu être enregistrés, il a été montré que ces neurones peuvent décharger en corrélation avec la respiration (Frysinger et Harper, 1989). Sur le plan anatomique, j'ai répertorié 3 voies par lesquelles l'hippocampe pourrait moduler l'activité de la respiration :

- La première possibilité se base sur les projections de l'hippocampe vers la matière grise peri-aqueductale. Cette dernière se projette directement sur le noyau du raphé obscur (Marchand et Hagino, 1983 ; voie bleue, Fig. 41).

- La deuxième voie, passant par un relai hippocampique, a été proposée par Harper *et al.* (1998). On sait que l'hippocampe se projette sur l'hypothalamus medial para-ventriculaire. Or l'hypothalamus se projette sur des structures pouvant moduler la respiration, comme le noyau du tractus solitaire ou les structures medullo-pontiques (Luiten *et al.*, 1985 ; Harper *et al.*, 1998 ; Fig. 41, voie violette). Ce qu'il y a d'intéressant dans cette voie, c'est que les structures olfactives se projettent aussi sur l'hypothalamus et cela donne au système la possibilité de shunter l'hippocampe.

- La troisième voie, passant par l'hippocampe, peut passer par le cervelet (Green et Arduini, 1954 ; voie rose, Fig. 41). Le cervelet pourrait faire partie de l'acte olfacto-moteur à cause de plusieurs raisons. Premièrement, le cervelet est impliqué dans le contrôle visuo-moteur (Lisberger et Sejnowski, 1992). Il reçoit des informations visuelles et permet de moduler les mouvements des yeux. Il est donc probable qu'il puisse également être impliqué dans le contrôle d'un acte moteur associé à un autre sens. D'ailleurs, le cervelet peut non seulement être activé par une stimulation odorante mais également par le flairage (sans odeur ; Sobel *et al.* 1998b). De plus, ces auteurs ont pu montrer des déficits olfactifs chez les patients présentant une lésion unilatérale du cervelet (Mainland *et al.*, 2005). Enfin, l'activité du cervelet est liée à la respiration. L'inhibition de certains modules du cervelet peut influencer la respiration (Moruzzi, 1940). Et, Colebatch *et al.* (1991) montrent, dans une étude d'imagerie par tomographie par émission de positons chez l'Homme, que lorsque les sujets modifient volontairement leur respiration, le cervelet est activé.

Les deux dernières voies possibles ne passent pas par l'hippocampe :

- La quatrième voie implique également le cervelet (voie orange, Fig. 41). Elle correspond à la voie système olfactif - aire tegmentale ventrale - cervelet. Anatomiquement, les structures olfactives se projettent sur l'aire tegmentale ventrale (Watabe-Uchida *et al.*, 2012) qui elle-même se projette sur le cervelet (Ikai *et al.*, 1992). Un argument en faveur de cette voie est que la stimulation électrique (Clarke et Trowill, 1971) ou par le biais de l'optogénétique (Tsai *et al.*, 2009) de l'aire tegmentale ventrale induit du flairage.

- Enfin, on peut trouver une cinquième possibilité, les cellules du BO se projettent de façon directe sur l'amygdale (Igarashi *et al.*, 2012). Or l'amygdale se projette sur le noyau parabrachial, contenu dans les structures ponto-medullaires et pouvant contrôler la respiration (Gallego *et al.*, 2001). Par cette dernière voie *via* l'amygdale, un contrôle moteur rapide pourrait s'effectuer (voie verte, Fig. 41). De façon intéressante, le noyau parabrachial pourrait également faire partie des structures respiratoires se projetant de façon indirecte sur le BO (Ravel et Pager, 1990). Ce noyau pourrait donc être un carrefour permettant d'envoyer des informations concernant la respiration aux structures olfactives et réciproquement, de contrôler la respiration en fonction des entrées olfactives.

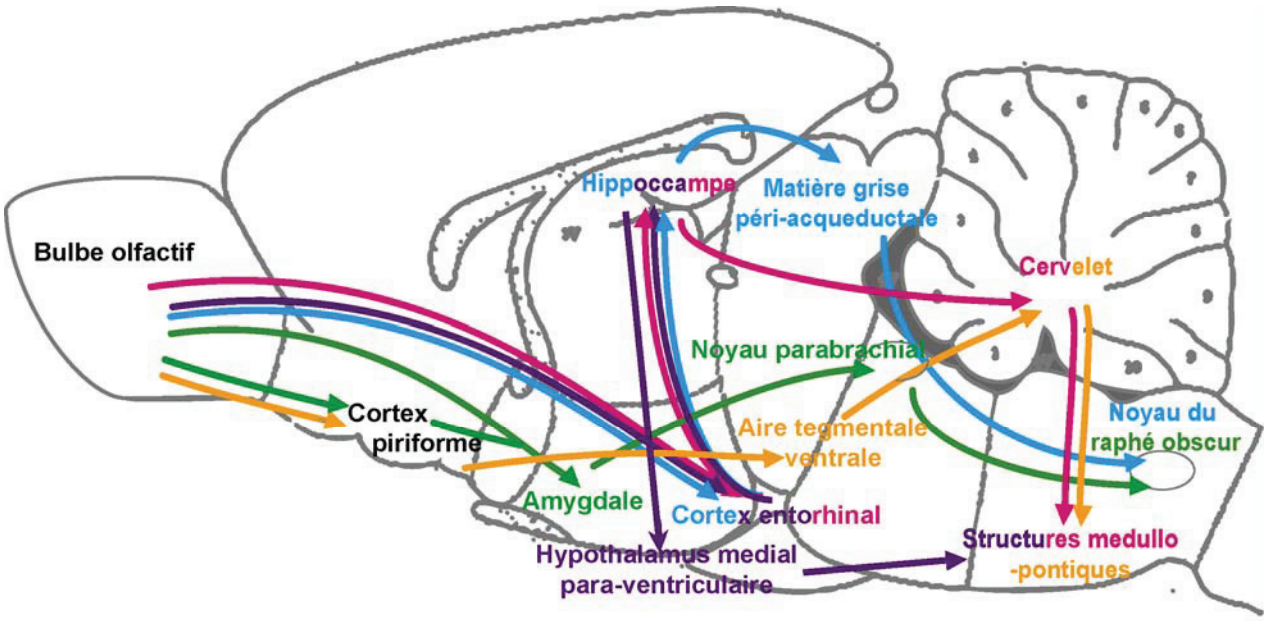


Figure 41 Voies possibles du contrôle de l'acte olfacto-moteur. Schéma d'une coupe sagittale de cerveau de rat. Chaque zone est grossièrement représentée sur ce schéma et ce dernier ne tient pas compte de la latéralité de la structure. Cinq voies sont représentées chacune dans une couleur différente. Les aires qui sont écrites en plusieurs couleurs signifient qu'elles reçoivent des entrées de voies différentes. Par exemple, le cervelet reçoit l'information provenant de la voie de l'aire tegmentale ventrale (en orange) et de celle de l'hippocampe (en rose).

Pour terminer cette partie, je souhaitais faire un aparté sur le contrôle olfacto-moteur chez les vertébrés non mammifères. Il a été récemment démontré, chez la lamproie, que la stimulation odorante augmentait significativement le déplacement de ces animaux. En utilisant des méthodes de traçage de voies et d'électrophysiologie, Derjean *et al.*, (2010) ont montré que la stimulation odorante active le BO et que ce dernier active alors le tuberculum postérieur, qui selon les auteurs serait l'équivalent de l'aire tegmentale ventrale. Enfin le tuberculum postérieur se projette sur les régions locomotrices mésencéphaliques pour atteindre les cellules réticulo-spinales. Ce qui est intéressant dans cette étude, c'est de pouvoir étudier un acte olfacto-moteur

chez un organisme dont le système nerveux est moins complexe que celui des mammifères. Cela peut également nous aider à déterminer par quelle voie commencer l'étude de l'acte olfacto-moteur. Effectivement, si le tuberculum postérieur est l'équivalent de l'aire tegmentale ventrale, on peut alors par analogie commencer par l'étude de cette voie.

4.4.3 Supports de communication entre les aires du circuit olfacto-moteur : des hypothèses sur les rythmes cérébraux et perspectives de travail

Nous venons de voir quelques unes des voies que peut emprunter le circuit olfacto-moteur et la question suivante est de savoir comment les structures impliquées dans ces voies communiquent entre elles pour réaliser un ajustement moteur extrêmement rapide. Les oscillations ont été proposées pour être un bon support de communication entre aires cérébrales. Selon Buzsáki et Draguhn (2004) « la synchronie se basant sur les oscillations est le mécanisme physique le plus efficace pour la coordination temporelle ». Les oscillations offrent les avantages de sélection temporelle de l'input, de plasticité synaptique, de pouvoir lier les assemblées de cellules, de pouvoir consolider et combiner des informations apprises et enfin de pouvoir représenter l'information en fonction de la phase des oscillations. Dans notre contexte, nous souhaitions proposer un support pour la communication rapide entre aires impliquées dans le circuit olfacto-moteur. Nous allons donc proposer deux rythmes oscillatoires qui pourraient être le support de communication entre les aires du circuit olfacto-moteur. Comme rythmes possibles, je propose tout d'abord l'oscillation thêta et nous verrons ensuite l'oscillation beta.

4.4.3.1 Rythme dans la bande de fréquence thêta

Le thêta, comme nous allons le voir, se retrouve dans différentes structures cérébrales pouvant être impliquées dans le circuit olfacto-moteur. De plus, on peut observer des relations spécifiques dans cette bande de fréquence entre certaines structures et c'est pourquoi le thêta a été proposé par différents auteurs (Komisaruk, 1970 ; Vanderwolf, 2001) comme l'un des supports permettant la transmission de l'information entre structures et un contrôle olfacto-moteur rapide.
Avant de discuter de l'oscillation thêta comme une base de communication possible, je souhaitais faire une petite distinction entre la modulation respiratoire et le thêta.

4.4.3.1.1 Différencier le thêta de la modulation respiratoire

Comme énoncé dans le paragraphe 4.2.2.2, l'un des rythmes proéminents du cerveau de mammifère est le rythme thêta hippocampique (6-12Hz). Parce que la modulation respiratoire du BO occupe une plage de fréquences qui chevauche celle de l'oscillation thêta, beaucoup d'auteurs ont assimilé la modulation respiratoire au rythme thêta. Mais bien que ces deux oscillations partagent la même fréquence, il faut bien distinguer le fait qu'elles n'ont pas les mêmes origines. Effectivement, on peut tout d'abord enregistrer deux types de thêta hippocampique, l'un atropine dépendant et l'autre non (Leung, 1984). Cela est certainement lié au fait que l'on trouve deux générateurs différents, l'un incluant une boucle avec le septum median de la bande de Broca et l'autre avec le cortex entorhinal (Buszáki, 2002). Dans le cas de la modulation respiratoire, cette dernière est toujours présente lorsque l'on sectionne ou abolit la communication entre le bulbe et le cortex (Gray et Skinner, 1988b). Et l'origine majoritaire de la modulation respiratoire est périphérique, ce qui signifie que contrairement au thêta hippocampique, la modulation respiratoire, n'est pas générée par un facteur rythmique interne, et il faut donc les distinguer en ce sens. Ces origines différentes n'empêcheront pas ces deux rythmes, dans certaines conditions, d'être en cohérence et/ou d'être phasés et même d'être entrainé l'un par l'autre.

4.4.3.1.2 L'oscillation thêta : un rythme commun à plusieurs structures cérébrales

Nous avons proposé une liste de structures pouvant être impliquées dans le circuit olfacto-moteur. Parmi elles, de nombreuses peuvent exprimer une oscillation dans la bande de fréquence thêta. On retrouve, bien sûr, les structures olfactives qui expriment la modulation respiratoire (Pour revue, Buonviso *et al.,* 2006).

Les 3 premières voies énoncées précédemment, comprenaient le cortex entorhinal et l'hippocampe. Ces deux structures présentent toutes les deux une oscillation thêta (respectivement, Deshmukh *et al.*, 2010 et Vanderwold, 1969 ; Bland, 1986). La troisième voie présentée faisait intervenir le cervelet. Or ce dernier, peut également présenter une oscillation au rythme thêta (Wikgren *et al.*, 2010). Enfin l'un des protagonistes de la quatrième voie était l'aire tegmentale ventrale et cette dernière peut aussi exprimer une oscillation dans la bande de fréquence du thêta (Fujisawa et Buzsáki, 2011).

Différentes structures pouvant faire partie du circuit olfacto-moteur peuvent donc exprimer des oscillations dans la bande de fréquence du thêta. Nous allons voir qu'il existe des arguments fonctionnels en faveur d'une relation spécifique entre ces aires à la fréquence thêta.

4.4.3.1.3 Arguments fonctionnels

Comme on l'a vu dans l'introduction, l'exploration fait intervenir différents mouvements, le flairage ou encore les mouvements des vibrisses. Ces deux activités sont rythmiques et ont une fréquence qui chevauche la bande de fréquence de l'oscillation thêta. Or, il a été démontré que ces mouvements ont

une relation spécifique avec le thêta hippocampique. Komisaruk (1970) a montré qu'à un niveau supérieur à la chance, les mouvements des vibrisses, le flairage et le thêta hippocampique étaient synchronisés. En particulier, lors de l'échantillonnage d'une odeur, Macrides *et al.* (1982) ont pu démontrer que les cycles de flairage possédaient une phase spécifique par rapport au thêta hippocampique. Et cette phase peut varier en fonction de la fréquence d'échantillonnage. On voit donc une première relation fonctionnelle entre les mouvements rythmiques et le thêta dans l'une des structures cérébrales pouvant faire partie du circuit olfacto-moteur. Ensuite, concernant la modulation respiratoire enregistrée dans le BO, Kay (2005) a montré une cohérence spécifique entre le rythme respiratoire bulbaire et le thêta hippocampique. Cette cohérence est spécifique à la période d'échantillonnage de l'odeur. Cela pourrait donc être un argument en faveur de l'oscillation thêta comme support de communication, notamment, pour les 3 premières voies proposées (4.4.2). C'est aussi supporté par le fait que le thêta présent dans le cervelet peut être corrélé au thêta hippocampique. Wikgren *et al.* (2010) ont montré une synchronisation de phase spécifique entre le thêta hippocampique et le thêta du cervelet lors de la réponse au conditionnement au clignement d'œil chez le lapin. Enfin, un autre circuit proposé précédemment pourrait également utiliser l'oscillation thêta comme mode de communication. Effectivement, au moment du choix dans une tâche de mémoire de travail, il a été montré des relations de phase spécifiques entre l'oscillation dans la bande de fréquence du thêta (4Hz) de l'aire tegmentale ventrale et le thêta hippocampique (Fujisawa et Buzsáki, 2011).

L'oscillation thêta n'est pas le seul rythme commun à différentes aires. Effectivement dans les structures olfactives on peut retrouver des oscillations plus rapides : beta et gamma.

4.4.3.2 Rythme dans la bande de fréquence beta

L'oscillation beta (10-30Hz) a été proposée comme un phénomène reflétant l'activité coordonnée d'aires cérébrales distantes. Par exemple, lors d'une tâche visuelle de mémoire à court terme, Tallon-Baudry *et al.* (1999) ont montré une synchronisation spécifique entre aires cérébrales distantes dans la bande de fréquence beta. Ces oscillations beta diminuent en puissance lorsque les performances des sujets diminuent.

Dans le système olfactif, on retrouve les oscillations beta (Pour revue, Buonviso *et al.*, 2006). Elles s'expriment dans le BO et dans le cortex (Martin *et al.*, 2004 ; 2006). L'oscillation beta est présente dans l'hippocampe (Vanderwolf, 1992) et on la retrouve également dans l'amygdale baso-latérale (Chapuis *et al.,* 2009). Plusieurs structures pouvant faire partie du circuit olfacto-moteur expriment donc l'oscillation beta. De façon très intéressante, cette oscillation est corrélée à des moments clés dans certaines tâches comportementales. Dans le BO et le cortex piriforme, différents auteurs ont pu corréler l'expression de l'oscillation beta à l'apprentissage de la tâche (Martin *et al.*, 2004 ; Martin *et al.* 2006). Dans une aversion conditionnée à l'odeur, Chapuis *et al.* (2009) ont

montré l'émergence de bouffées d'oscillations beta corrélées au comportement de l'animal (acquisition de la tâche) et communes aux aires impliquées dans l'aversion (BO, cortex piriforme, amygdale baso-latérale, cortex insulaire, cortex infra-limbique et cortex orbito-frontal). De la même façon, dans une tâche de discrimination des odeurs chez le rat, Kay et Beschel (2010) ont montré une cohérence spécifique dans la bande de fréquence beta entre BO et cortex piriforme lors du flairage des odeurs. Le beta se place donc comme un candidat sérieux pour la communication entre aires cérébrales éloignées. Si l'on revient aux aires pouvant être impliquées dans l'acte olfacto-moteur, il a été montré que le gyrus dente de l'hippocampe répondait à une stimulation odorante en exprimant une bouffée oscillatoire beta (Vanderwolf, 1992). De plus, dans une tâche olfactive, Gourévitch *et al.*, (2010) ont montré une cohérence des oscillations beta entre l'hippocampe et le BO (d'après les données de Martin *et al.*, 2007). La synchronisation entre les structures olfactives et l'amygdale est également possible dans cette bande de fréquence (Chapuis *et al.*, 2009). Les circuits présumés faisant intervenir l'hippocampe et l'amygdale pourraient donc utiliser l'oscillation beta comme support de communication.

Finalement, plusieurs gammes de fréquence peuvent permettre la communication entre les aires faisant hypothétiquement partie du circuit olfacto-moteur. Il est évident que l'on ne peut pas, pour le moment, déterminer quel type d'oscillation permet la communication entre ces aires. D'autant qu'il est tout à fait possible, comme le montre Fujisawa et Buszáki (2011) que les systèmes utilisent plusieurs bandes de fréquences.

4.4.3.3 Perspectives de travail

L'une des futures directions de l'équipe est clairement de déterminer le circuit olfacto-moteur ou en tout cas, certains de ses composants et de trouver quelle bande de fréquence utilisent les différentes aires pour communiquer. Parce que le cervelet est une zone clé pour la modulation des mouvements visuels, qu'il est activé par une stimulation odorante et peut moduler la respiration, nous avons posé l'hypothèse que ce soit une des structures centrales impliquée dans le contrôle olfacto-moteur. Nous faisons l'hypothèse que l'acte olfacto-moteur fait intervenir les structures olfactives (BO et cortex), l'hippocampe et le cervelet. Le choix de l'hippocampe s'est basé sur les travaux de Macrides (1982) et Vanderwolf (1992) mais aussi parce que nous avons réalisé chez l'animal anesthésié une série d'expériences dans lesquelles nous enregistrions le BO et l'hippocampe alors que l'on imposait un flairage à différentes fréquences à l'animal (Partie annexes, poster pages 215-216). Cette pré-expérience nous a permis de mieux connaître les signaux hippocampiques et de déterminer les outils et points importants à développer pour l'animal vigile. De plus, nous avons montré que, quelle que soit la fréquence respiratoire imposée, un signal à cette fréquence se retrouvait superposé au rythme présent dans l'hippocampe.

Pour commencer à étudier les structures impliquées et les rythmes qu'elles peuvent utiliser pour se synchroniser, nous avons implanté 3 rats avec des électrodes dans le BO, le cortex piriforme antérieur, le cortex piriforme postérieur et l'hippocampe. Nous n'avons pas implanté dans le cervelet, car l'implantation est plus délicate. Au dessus du cervelet passent de nombreux sinus veineux, par conséquent cette implantation nécessite un vrai savoir-faire, que nous espérons développer rapidement.

Dans la cage de pléthysmographie, il n'est pas possible d'utiliser un système filaire, nous avons donc utilisé un système d'enregistrement du potentiel de champ local par télémétrie (EMKA Technologies). Les signaux s'avèrent être de très bonne qualité et surtout passionnants et riches mais nous n'en sommes qu'aux balbutiements du traitement. Nous avons tout de même pu observer la présence d'oscillations dans la bande thêta et dans la bande beta s'exprimant en même temps dans les 4 structures enregistrées et à des moments spécifiques de la tâche olfactive (Fig. 42). Il est possible que l'oscillation beta observée soit la signature du contrôle de l'acte olfacto-moteur passant par le cortex piriforme et l'hippocampe.

Ces données sont donc très encourageantes, et c'est un énorme travail qu'il reste à faire pour implanter d'autres rats avec une électrode dans le cervelet et ensuite déterminer le support de la communication entre les aires. Une étudiante en M2 va commencer ce travail qui j'espère se poursuivra avec une thèse. L'équipe recherche et développement développe en ce moment un système d'enregistrement des potentiels d'action en extracellulaire sans fil. Cela nous permettra d'aller encore plus loin dans la compréhension de la communication entre les aires cérébrales.

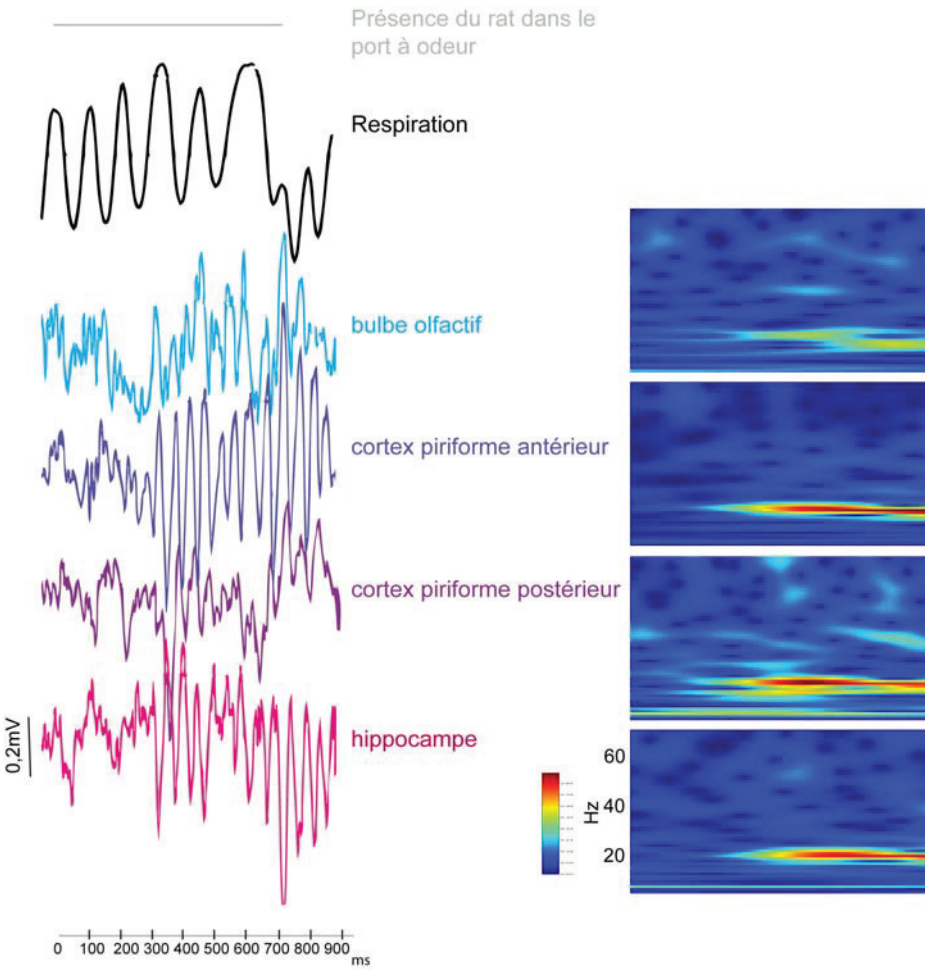


Figure 42 Possible synchronisation des aires olfactives et de l'hippocampe : un pas vers l'acte olfacto-moteur? A gauche, et du haut vers le bas, sont représentés: en gris, la présence du rat dans le port à odeur, signifiant qu'une odeur a été délivrée ; en noir, la respiration ; en cyan, le signal bulbaire, en bleu marine, le signal du cortex piriforme antérieur, en violet, le signal du cortex piriforme postérieur et en rose, le signal de l'hippocampe. A droite sont représentées les cartes temps-fréquence associées à chacun des signaux. On voit très nettement que 300 ms après l'arrivée dans le port à odeur, une bouffée beta apparait dans l'ensemble des structures enregistrées. Il est possible que cette oscillation d'une fréquence moyenne de 20 Hz soit la signature du contrôle olfacto-moteur à travers ces structures.

4.4.4 Rôle(s) du contrôle olfacto-moteur

Nous avons vu quels étaient les structures et les possibles modes de communication pouvant permettre un contrôle olfacto-moteur. Je souhaitais, pour terminer, revenir sur le rôle du contrôle du flairage dans la perception olfactive. Je ne pense pas que ce contrôle n'ait qu'une seule fonction, mais au contraire plusieurs. Effectivement, comme on l'a vu dans l'introduction le flairage s'adapte en fonction de l'hédonicité et de la concentration des molécules. Cette dernière adaptation peut donc permettre de jouer sur la quantité de stimulus présent. Nous nous sommes intéressées à la relation entre la qualité des molécules odorantes et les variations de flairage. Notre hypothèse était qu'un animal allait adapter son flairage de façon à optimiser le dépôt des molécules odorantes sur les sites les plus aptes à les recevoir. Nous avons montré dans l'étude 3 que l'animal flaire de la même façon deux odeurs proches. Et nous avons observé, pour la moitié des paires dissimilaires, de très fortes

variations de flairage. Le fait que l'animal adapte son flairage lorsqu'il est confronté à des odeurs dissimilaires signifie bien que la qualité des molécules a une influence sur le flairage. Le fait que qu'il n'y ait que peu de variations de flairage dans deux de nos paires d'odeurs dissimilaires n'invalide pas notre hypothèse mais signifie que le flairage est fonction des molécules odorantes et certainement d'autres paramètres, comme le nombre de récepteurs ou leur affinité, qu'on ne peut pas quantifier pour le moment. On ne peut donc pas faire de relation linéaire exacte entre UNE propriété physico-chimique des odeurs et les variations de flairage. Une question à laquelle nous n'avons pas encore répondu et qui ne nous permet pas encore de valider l'hypothèse de départ est : est-ce que ces variations de flairage sont nécessaires et aident-elles à la discrimination ? Comme décrit dans les perspectives de l'étude 3, il nous faut répondre à cette question en utilisant un test comportemental différent.

Au début de cette expérience, je considérais le flairage comme utile pour à la fois améliorer la quantité et la qualité de l'activation du système olfactif mais ma vision des choses a quelque peu changé avec nos résultats. Dans l'étude 3, nous avons montré qu'en fonction de la paire d'odeur dans laquelle elle est présentée, une odeur induit différents patterns de flairage. Ce que nous avons appelé les variations de flairage en fonction du « contexte » odorant. Finalement, contrairement à l'idée que je m'en étais faite à la base, le flairage serait un comportement très élaboré et contexte dépendant. Nos résultats sont tout à fait cohérents avec les études de Wesson *et al.* (2008 b) montrant une différence de flairage en fonction de la tâche comportementale. L'adaptation au contexte pourrait permettre à l'animal d'optimiser la discrimination entre deux odeurs. Cette fonction plus élaborée du flairage est également à mettre en relation avec le fait que l'exploration active le flairage (Welker, 1964). De façon plus globale, le flairage pourrait permettre d'augmenter l'attention. Cela pourrait être rendu possible en mettant sous tension le système olfactif et en pré-activant la communication avec d'autres aires cérébrales. Par exemple, chez l'Homme, le flairage sans odeur active à la fois le cortex piriforme et le cervelet (Sobel *et al.*, 1998 a, b). Le système olfactif serait donc, par ce biais, prêt à recevoir de l'information de façon optimale.

4.5 Conclusion générale

L'ensemble de nos données montre que la dynamique respiratoire influence l'activité du système olfactif et que, réciproquement, une odeur ou un contexte odorant peuvent modifier la façon de flairer. Finalement et de façon très importante, ces données tendent à montrer que l'échantillonnage d'une odeur est similaire à l'échantillonnage des autres sens comme les saccades visuelles ou les mouvements des vibrisses. Dans le système visuel, un sujet peut à la fois adapter finement ses mouvements oculaires mais il peut aussi de façon plus globale jouer sur les mouvements de la tête. Il serait donc là aussi intéressant de savoir si l'on peut généraliser l'adaptation olfacto-motrice à des mouvements plus « grossiers » comme les mouvements de la tête. Un indice va d'ailleurs en ce sens, puisqu'un rat qui suit une piste odorante ne fait seulement varier sa respiration mais réalise aussi des mouvements spécifiques de la tête pour pouvoir suivre la trace odorante (Khan *et al.*,2012).

D'un point de vue plus appliqué, mieux comprendre les relations entre odeur, flairage et activités neuronales du système olfactif peut ouvrir de nouvelles voies quant à la façon d'approcher les déficits olfactifs de nombreuses maladies neurodégénératives. Sobel *et al.* (2001) ont montré chez des sujets atteints de la maladie de Parkinson que leur inhabilité à détecter les odeurs était corrélée à leur faible vigueur de flairage. Or si l'on force la vigueur de flairage, alors la perception chez ces sujets est augmentée. Ces résultats ne signifient pas que le déficit de flairage est la cause des déficits olfactifs mais qu'il y participe. Savoir précisément comment l'acte olfacto-moteur fonctionne ouvre donc des perspectives intéressantes.

5 REFERENCES

A

- Abaffy, T. Defazio, A.R. (2011) The location of olfactory receptors within olfactory epithelium is independent of odorant volatility and solubility. BMC Res Notes. 4:137.
- Abraham, N.M., Spors, H, Carleton, A, Margrie, T.W, Kuner, T Schaefer, A.T. (2004) Maintaining accuracy at the expense of speed: stimulus similarity defines odor discrimination time in mice. Neuron. 44:865-876.
- Ache, B.W. Young, J.M. (2005) Olfaction: diverse species, conserved principles. Neuron. 48 :417-430.
- Adrian, E.D. (1942) Olfactory reactions in the brain of the hedgehog. J Physiol. 100:459-473.
- Adrian, E.D. (1950) The electrical activity of the mammalian olfactory bulb. Electroencephalogr Clin Neurophysiol. 2:377-388.
- Adrian, E.D. (1951) The role of air movement in olfactory stimulation. J Physiol. 114:4-5p.
- Adrian, E.D. (1954) The sensory mechanism of the olfactory organ. Boll Soc Ital Biol Sper. 30:411-417.
- Adrian, E.D. Ludwig, C. (1938) Nervous discharges from the olfactory organs of fish. J Physiol. 94:441-460.
- Alberts, J.R. May, B. (1980) Development of nasal respiration and sniffing in the rat. Physiol Behav. 24:957-963.
- Allison, A.C. (1953) The structure of the olfactory bulb and its relationship to the olfactory pathways in the rabbit and the rat. J Comp Neurol. 98:309-353.
- Araneda, R.C. Kini, A.D. Firestein, S. (2000) The molecular receptive range of an odorant receptor. Nat Neurosci. 3:1248-1255.
- Astic, L. Saucier, D. (1986) Anatomical mapping of the neuroepithelial projection to the olfactory bulb in the rat. Brain Res Bull. 16:445-454.
- Astic, L. Saucier, D. Holley, A. (1987) Topographical relationships between olfactory receptor cells and glomerular foci in the rat olfactory bulb. Brain Res. 424:144-152.
- Aungst, J.L. Heyward, P.M. Puche, A.C. Karnup, S.V. Hayar, A. Szabo, G. Shipley, M.T. (2003) Centre-surround inhibition among olfactory bulb glomeruli. Nature. 426:623-629.

B

- Bardoni, R. Magherini, P.C. Belluzzi, O. (1996) Excitatory synapses in the glomerular triad of frog olfactory bulb in vitro. Neuroreport. 7:1851-1855.
- Bathellier, B. Buhl, D.L. Accolla, R. Carleton, A. (2008) Dynamic ensemble odor coding in the mammalian olfactory bulb: sensory information at different timescales. Neuron. 57: 586-598.
- Becker, C.J. Freeman, W.J. (1968); Pattern analysis of cortical evoked potential parameters during attention changes. Physiol Behav. 4: 67-77
- Bensafi, M. Porter, J. Pouliot, S. Mainland, J. Johnson, B. Zelano, C. Young, N. Bremner, E. Aframian, D. Khan, R. Sobel, N. (2003) Olfactomotor activity during imagery mimics that during perception. Nat Neurosci. 6:1142-1144.
- Bensafi, M. Pouliot, S. Sobel, N. (2005) Odorant-specific patterns of sniffing during imagery distinguish 'bad' and 'good' olfactory imagers. Chem Senses. 30:521-529.
- Bhalla, U.S. Bower, J.M. (1997) Multiday recordings from olfactory bulb neurons in awake freely moving rats: spatially and temporally organized variability in odorant response properties. J Comput Neurosci. 4:221-256.
- Bland, B.H. (1986) The physiology and pharmacology of hippocampal formation thêta rhythms. Prog Neurobiol. 26:1-54.
- Bocca, E. Antonelli, A.R. Mosciaro, O. (1965) Mechanical co-factors in olfactory stimulation. Acta otolaryng. 59:243-247.
- Borisovska, M. McGinley, M.J. Bensen, A. Westbrook, G.L. (2011) Loss of olfactory cell adhesion molecule reduces the synchrony of mitral cell activity in olfactory glomeruli.J Physiol. 589:1927-1241.
- Bressler, S.L. (1984) Spatial organization of EEGs from olfactory bulb and cortex. Electroencephalogr Clin Neurophysiol. 57:270-276.
- Bressler, S.L. (1987) Relation of olfactory bulb and cortex. II. Model for driving of cortex by bulb. Brain Res. 409:294-301.
- Bressler, S.L. Freeman, W.J. (1980) Frequency analysis of olfactory system EEG in cat, rabbit, and rat. Electroencephalogr Clin Neurophysiol. 50:19-24.
- Briffaud V., Fourcaud-Trocmé, N. Messaoudi, B. Buonviso, N. Amat, C. (2012) The Relationship between Respiration-Related Membrane Potential Slow Oscillations and Discharge Patterns in Mitral/Tufted Cells: What Are the Rules?PLoS One. 7:e43964.
- 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. Berthommier, F. (1992) Temporal pattern analyses in pairs of neighboring mitral cells. J Neurophysiol. 68:417-424.
- Buonviso, N. Revial, M.F. Jourdan, F. (1991) The Projections of Mitral Cells from Small Local Regions of the Olfactory Bulb: An Anterograde Tracing Study Using PHA-L (Phaseolus vulgaris Leucoagglutinin). Eur J Neurosci. 3:493-500.
- Buonviso, N. Amat, C. Litaudon, P. (2006) Respiratory modulation of olfactory neurons in the rodent brain. Chem Senses. 31:145-154.
- Buonviso, N. Amat, C. Litaudon, P. Roux, S. Royet, J.P. Farget, V. Sicard, G. (2003) Rhythm sequence through the olfactory bulb layers during the time window of a respiratory cycle. Eur J Neurosci. 17:1811-1819
- Buzsáki, G. (2002) Thêta oscillations in the hippocampus. Neuron. 33:325-340.
- Buzsáki, G. Draguhn, A (2004) Neuronal oscillations in cortical networks. Science. 304:1926-1629.

C

- Cajal, S.R. (1911) Histologie du Système Nerveux de l'Homme et des Vertébrés, Edition. Maloine, Paris.
- Cang, J. Isaacson, J.S. (2003) In vivo whole-cell recording of odor-evoked synaptic transmission in the rat olfactory bulb. J Neurosci. 23:4108-4116.
- Cao, Y. Roy, S. Sachdev, R.N.S Heck, D.H. (2012) Dynamic correlation between whisking and breathing rhythms in mice. J Neurosci. 32:1653-1659.
- Carey, R.M. Verhagen, J.V. Wesson, D.W. Pírez, N. Wachowiak, M. (2009) Temporal structure of receptor neuron input to the olfactory bulb imaged in behaving rats. J Neurophysiol. 101:1073-1088.
- Carlson, G.C. Shipley, M.T. Keller, A. (2000) Long-lasting depolarizations in mitral cells of the rat olfactory bulb. J Neurosci. 20:2011-2021.
- Cenier, T. Amat, C. Litaudon, P. Garcia, S. Lafaye de Micheaux, P. Liquet, B. Roux, S. Buonviso, N. (2008) Odor vapor pressure and quality modulate LFP oscillatory patterns in the olfactory bulb of anesthetized rat. Eur J Neurosci. 27:1432-1442.
- Cenier, T. David, F. Litaudon, P. Garcia, S. Amat, C. Buonviso, N. (2009) Respiration-gated formation of gamma and beta neural assemblies in the mammalian olfactory bulb. Eur J Neurosci. 29:921-930.
- Chapuis, J. Garcia, S. Messaoudi, B. Thevenet, M. Ferreira, G. Gervais, R. Ravel, N. (2009) The way an odor is experienced during aversive conditioning determines the extent of the network recruited during retrieval: a multisite electrophysiological study in rats. J Neurosci. 29:10287-10298.

- Chaput, M.A. (2000) EOG responses in anesthetized freely breathing rats. Chem Senses. 25:695-701.
- Chaput, M.A. Buonviso, N. Berthommier, F. (1992) Temporal Patterns in Spontaneous and Odour-evoked Mitral Cell Discharges Recorded in Anaesthetized Freely Breathing Animals. Eur J Neurosci. 4:813-822.
- Chaput, M.A. Chalansonnet, M. (1997) Recording the slow potentials evoked by odors in the olfactory mucosa of awake animals. J Neurosci Methods. 75:193-198.
- Chaput, M.A. Duchamp-Viret, P. Duchamp, A. (2002) Recordings from olfactory receptor neurons in the rat. In: Simon SA, Nicolelis MAL, editors. Methods in chemosensory research.
- Chaput, M.A. Holley, A. (1979) Spontaneous activity of olfactory bulb neurons in awake rabbits, with some observations on the effects of pentobarbital anaesthesia. J Physiol (Paris). 75:939-948.
- Chaput, M.A. Holley, A. (1980) Single unit responses of olfactory bulb neurones to odour presentation in awake rabbits. J Physiol (Paris). 76:551-558.
- Charpak, S. Mertz, J. Beaurepaire, E. Moreaux, L. Delaney, K. (2001) Odor-evoked calcium signals in dendrites of rat mitral cells. Proc Natl Acad Sci U S A. 98:1230-1234.
- Chen, W.R. Shepherd, G.M. (1997) Membrane and synaptic properties of mitral cells in slices of rat olfactory bulb. Brain Res. 745:189-196.
- Cheung, M.C. Carey, R.M. Wachowiak, M. (2009) A method for generating natural and user-defined sniffing patterns in anesthetized or reduced preparations. Chem Senses 34:63-76.
- Christie, J.M. Westbrook, G.L. (2006) Lateral excitation within the olfactory bulb. J Neurosci. 26:2269-2277.
- Clarke, S. Panksepp, J. Trowill, J. Pankseep, J. (1970) A method of recording sniffing in the free-moving rat. Physiol Behav. 5:125-126.
- Clarke, S. Trowill, J.A. (1971) Sniffing and motivated behavior in the rat. Physiol Behav. 6:49–52.
- Colebatch, J.G. Adams, L. Murphy, K. Martin, A.J. Lammertsma, A.A. Tochon-Danguy, H.J. Clark, J.C. Friston, K.J. Guz, A. (1991) Regional cerebral blood flow during volitional breathing in man. J Physiol. 443:91-103.
- Courtiol, E. Amat, C. Thévenet, M. Messaoudi, B. Garcia, S. Buonviso, N. (2011a) Reshaping of bulbar odor response by nasal flow rate in the rat. PLoS One. 6:e16445.
- Courtiol, E. Hegoburu, C. Litaudon, P. Garcia, S. Fourcaud-Trocmé, N. Buonviso, N. (2011b) Individual and synergistic effects of sniffing frequency and flow rate on olfactory bulb activity. J Neurophysiol. 106:2813-2824.

- Craven, B.A. Paterson, E.G. Settles, G.S. Lawson, M.J. (2009) Development and verification of a high-fidelity computational fluid dynamics model of canine nasal airflow. J Biomech Eng. 131:091002.
- Cury, K.M. Uchida, N. (2010) Robust odor coding via inhalation-coupled transient activity in the mammalian olfactory bulb. Neuron. 68:570-585

D

- Dauger, S. Nsegbe, E. Vardon, G. Gaultier, C. Gallego, J. (1998) The effects of restraint on ventilatory responses to hypercapnia and hypoxia in adult mice. Respir Physiol. 112:215-225.
- Daval, G. Leveteau, J. MacLeod, P. (1970) Local electroolfactogram and olfactory discrimination in frogs. J Physiol (Paris). 62:477-488.
- David, F.O. Hugues, E. Cenier, T. Fourcaud-Trocmé, N. Buonviso, N. (2009) Specific entrainment of mitral cells during gamma oscillation in the rat olfactory bulb. PLoS Comput Biol. 5:e1000551.
- De Saint Jan, D. Hirnet, D. Westbrook, G.L. Charpak, S. (2009) External tufted cells drive the output of olfactory bulb glomeruli. J Neurosci. 29:2043-2052.
- De Saint Jan, D. Westbrook, G.L. (2005) Detecting activity in olfactory bulb glomeruli with astrocyte recording. J Neurosci. 25:2917-2924.
- De Saint Jan, D. Westbrook, G.L. (2007) Disynaptic amplification of metabotropic glutamate receptor 1 responses in the olfactory bulb. J Neurosci. 27:132-140.
- Depuy, S.D., Kanbar, R. Coates, M.B. Stornetta, R.L. Guyenet, P.G. (2011) Control of breathing by raphe obscurus serotonergic neurons in mice. J Neurosci. 31:1981-1990.
- Derjean, D. Moussaddy, A. Atallah, E. St-Pierre, M. Auclair, F. Chang, S. Ren, X. Zielinski, B. Dubuc, R. (2010) A novel neural substrate for the transformation of olfactory inputs into motor output. PLoS Biol. 8:e1000567.
- Deschênes, M. Moore, J. Kleinfeld, D. (2012) Sniffing and whisking in rodents. Curr Opin Neurobiol. 22:243-250.
- Desmaisons, D. Vincent, J.D. Lledo, P.M. (1999) Control of action potential timing by intrinsic subthreshold oscillations in olfactory bulb output neurons. J Neurosci. 19:10727-10737.
- Deshmukh, S.S. Yoganarasimha, D. Voicu, H. Knierim, J.J. (2010) Thêta modulation in the medial and the lateral entorhinal cortices. J Neurophysiol. 104:994-1006.
- Dhawale, A.K. Hagiwara, A. Bhalla, U.S. Murthy, V.N. Albeanu, D.F. (2010) Non-redundant odor coding by sister mitral cells revealed by light addressable glomeruli in the mouse. Nat Neurosci. 13:1404-1412.

- Doucette, W. Gire, D.H. Whitesell, J. Carmean, V. Lucero, M.T. Restrepo, D. (2011) Associative cortex features in the first olfactory brain relay station. Neuron. 69:1176-1187.
- Duchamp-Viret, P. Chaput, M.A. Duchamp, A. (1999) Odor response properties of rat olfactory receptor neurons. Science. 284:2171-2174.
- Duchamp-Viret, P. Kostal, L. Chaput, M. Lánsky, P. Rospars, J. (2005) Patterns of spontaneous activity in single rat olfactory receptor neurons are different in normally breathing and tracheotomized animals. J Neurobiol. 65:97-114.
- Duffin, J. Hockman, C.H. (1972) Limbic forebrain and midbrain modulation and phase-switching of expiratory neurons. Brain Res. 39:235-239.
- Du Pont, J.S. (1987) Firing patterns of bulbar respiratory neurones during sniffing in the conscious, non-paralyzed rabbit. Brain Res. 414:163-168.

E

- Elaagouby, A. Gervais, R. (1992) ACh-induced long-lasting enhancement in excitability of the olfactory bulb. Neuroreport. 3:10-12.
- Ennis, M. Hamilton, K. Hayar, A. (2007) Neurochemistry of the Main olfactory system, Edition. Berlin Heidelberg.
- Ennis, M. Zimmer, L.A. Shipley, M.T. (1996) Olfactory nerve stimulation activates rat mitral cells via NMDA and non-NMDA receptors in vitro. Neuroreport. 7:989-992.
- Esclassan, F. Courtiol, E. Thévenet, M. Garcia, S. Buonviso, N. Litaudon, P. (2012) Faster, deeper, better: the impact of sniffing modulation on bulbar olfactory processing. PLoS One 7:e40927.
- Ezeh, P.I. Davis, L.M. Scott, J.W. (1995) Regional distribution of rat electroolfactogram. J Neurophysiol. 73:2207-2220.

F

- Ferezou, I. Bolea, S. Petersen, C.C.H. (2006) Visualizing the cortical representation of whisker touch: voltage-sensitive dye imaging in freely moving mice. Neuron. 50:617-629.
- Fletcher, M.L. Masurkar, A.V. Xing, J. Imamura, F. Xiong, W. Nagayama, S. Mutoh, H. Greer, C.A. Knöpfel, T. Chen, W.R. (2009) Optical imaging of postsynaptic odor representation in the glomerular layer of the mouse olfactory bulb. J Neurophysiol. 102:817-830.
- Fontanini, A. Spano, P. Bower, J.M. (2003) Ketamine-xylazine-induced slow (< 1.5 Hz) oscillations in the rat piriform (olfactory) cortex are functionally correlated with respiration. J Neurosci. 23:7993-8001.

- Fourcaud-Trocmé, N. Courtiol, E. Buonviso, N. Voegtlin, T. (2011) Stability of fast oscillations in the mammalian olfactory bulb: experiments and modeling. J Physiol Paris. 105:59-70.
- Freeman, W.J. (1974) A model for mutual excitation in a neuron population in olfactory bulb. IEEE Trans Biomed Eng. 21:350-358.
- Freeman, W.J. Schneider, W. (1982) Changes in spatial patterns of rabbit olfactory EEG with conditioning to odors. Psychophysiology. 19:44-56.
- Freeman, W.J. Viana Di Prisco, G. (1986) Relation of olfactory EEG to behavior: time series analysis. Behav Neurosci. 100:753-763.
- Freeman, W.J. Viana Di Prisco, G. Davis, G.W. Whitney, T.M. (1983) Conditioning of relative frequency of sniffing by rabbits to odors. J Comp Psychol. 97:12-23.
- Freitag, J. Krieger, J. Strotmann, J. Breer, H. (1995) Two classes of olfactory receptors in Xenopus laevis. Neuron. 15:1383-1392.
- Frysinger, R.C. Harper, R.M. (1989) Cardiac and respiratory correlations with unit discharge in human amygdala and hippocampus. Electroencephalogr Clin Neurophysiol. 72:463-470.
- Fujisawa, S. Buzsáki, G. (2011) A 4 Hz oscillation adaptively synchronizes prefrontal, VTA, and hippocampal activities. Neuron. 72:153-165.
- Fukunaga, I. Berning, M. Kollo, M. Schmaltz, A. Schaefer, A.T. (2012) Two distinct channels of olfactory bulb output. Neuron. 75:320-329.

G

- Gallego, J. Nsegbe, E. Durand, E. (2001) Learning in respiratory control. Behav Modif. 25:495-512.
- Garcia, S. Fourcaud-Trocmé, N. (2009) OpenElectrophy: An Electrophysiological Data- and Analysis-Sharing Framework. Front Neuroinform. 3:14.
- Gervais, R. Buonviso, N. Martin, C. Ravel, N. (2007) What do electrophysiological studies tell us about processing at the olfactory bulb level? J Physiol Paris. 101:40-45.
- Ghosh, S. Larson, S.D. Hefzi, H. Marnoy, Z. Cutforth, T. Dokka, K. Baldwin, K.K. (2011) Sensory maps in the olfactory cortex defined by long-range viral tracing of single neurons. Nature. 472:217-220.
- Gire, D.H. Franks, K.M. Zak, J.D. Tanaka, K.F. Whitesell, J.D. Mulligan, A.A. Hen, R. Schoppa, N.E. (2012) Mitral cells in the olfactory bulb are mainly excited through a multistep signaling path. J Neurosci. 32:2964-2975.
- Gire, D.H. Schoppa, N.E. (2009) Control of on/off glomerular signaling by a local GABAergic microcircuit in the olfactory bulb. J Neurosci. 29:13454-13464.

- Goldberg, S.J. Moulton, D.G. (1987) Olfactory bulb responses telemetered during an odor discrimination task in rats. Exp Neurol. 96:430-442.
- Gourévitch, B. Kay, L.M. Martin, C. (2010) Directional coupling from the olfactory bulb to the hippocampus during a go/no-go odor discrimination task. J Neurophysiol. 103:2633-2641.
- Gray, C.M. Freeman, W.J. Skinner, J.E. (1986) Chemical dependencies of learning in the rabbit olfactory bulb: acquisition of the transient spatial pattern change depends on norepinephrine. Behav Neurosci. 100:585-596.
- Gray, C.M. Singer, W. (1989) Stimulus-specific neuronal oscillations in orientation columns of cat visual cortex.Proc Natl Acad Sci U S A. 86:1698-1702.
- Gray, C.M. Skinner, J.E. (1988a) Field potential response changes in the rabbit olfactory bulb accompany behavioral habituation during the repeated presentation of unreinforced odors. Exp Brain Res. 73:189-197.
- Gray, C.M. Skinner, J.E. (1988b) Centrifugal regulation of neuronal activity in the olfactory bulb of the waking rabbit as revealed by reversible cryogenic blockade. Exp Brain Res. 69:378-386.
- Green, J.D. Arduini, A.A. (1954) Hippocampal electrical activity in arousal. J Neurophysiol. 17:533-557.
- Griff, E.R. Mafhouz, M. Perrut, A. Chaput, M.A. (2008) Comparison of identified mitral and tufted cells in freely breathing rats: I. Conduction velocity and spontaneous activity. Chem Senses. 33:779-792.
- Grosmaitre, X. Santarelli, L.C. Tan, J. Luo, M. Ma, M. (2007) Dual functions of mammalian olfactory sensory neurons as odor detectors and mechanical sensors. Nat Neurosci. 10:348-354.
- Gschwend, O. Beroud, J. Carleton, A. (2012) Encoding odorant identity by spiking packets of rate-invariant neurons in awake mice. PLoS One. 2012;7(1):e30155.
- Gupta, N. Stopfer, M. (2011) Insect olfactory coding and memory at multiple timescales. Curr Opin Neurobiol. 21 :768-773.

H

- Haberly, L.B. Price, J.L. (1977) The axonal projection patterns of the mitral and tufted cells of the olfactory bulb in the rat. Brain Res. 129:152-157.
- Hahn, I. Scherer, P.W. Mozell, M.M. (1993) Velocity profiles measured for airflow through a large-scale model of the human nasal cavity. J Appl Physiol. 75:2273-2287.
- Halabisky, B. Friedman, D. Radojicic, M. Strowbridge, B.W. (2000) Calcium influx through NMDA receptors directly evokes GABA release in olfactory bulb granule cells.J Neurosci. 20:5124-5134.

- Harper, R.M. Poe, G.R. Rector, D.M. Kristensen, M.P. (1998) Relationships between hippocampal activity and breathing patterns. Neurosci Biobehav Rev. 22:233-236.
- Hayar, A. Karnup, S. Ennis, M. Shipley, M.T. (2004a) External tufted cells: a major excitatory element that coordinates glomerular activity. J Neurosci. 24:6676-6685.
- Hayar, A. Karnup, S. Shipley, M.T. Ennis, M. (2004b) Olfactory bulb glomeruli: external tufted cells intrinsically burst at thêta frequency and are entrained by patterned olfactory input. J Neurosci. 24:1190-1199.
- Hayar, A. Shipley, M.T. Ennis, M. (2005) Olfactory bulb external tufted cells are synchronized by multiple intraglomerular mechanisms. J Neurosci. 25:8197-8208.
- Hebb, D.O (1949) The organization of behavior, a neuropsychological theory, Edition. New York: Wiley.
- Hegoburu, C. Shionoya, K. Garcia, S. Messaoudi, B. Thévenet, M. Mouly, A.M. (2011) The RUB Cage: Respiration-Ultrasonic Vocalizations-Behavior Acquisition Setup for Assessing Emotional Memory in Rats. Front Behav Neurosci. 5:25.
- Holley, A. Mac Leod, P. (1977) Transduction et codage des informations olfactives chez les vertebras. J Physiol Paris, 73 725-828.
- Holst, D.V. Kolb, H. (1976) Sniffing Frequency of Tupaia belangeri: A Measure of Central Nervous Activity (Arousal) J comp Physiol. i05, 243-257
- Hornung, D.E. Mozell, M.M. (1977) Odorant removal from the frog olfactory mucosa. Brain Res. 128:158-163.
- Hornung, D.E. Mozell, M.M. (1980) Tritiated odorants to monitor retention in the olfactory and vomernasal organs. Brain Res. 181:488-492.

I

- Igarashi, K.M. Ieki, N. An, M. Yamaguchi, Y. Nagayama, S. Kobayakawa, K. Kobayakawa, R. Tanifuji, M. Sakano, H. Chen, W.R. Mori, K. (2012) Parallel mitral and tufted cell pathways route distinct odor information to different targets in the olfactory cortex. J Neurosci. 32:7970-7985.
- Ikai, Y. Takada, M. Shinonaga, Y. Mizuno, N. (1992) Dopaminergic and non-dopaminergic neurons in the ventral tegmental area of the rat project, respectively, to the cerebellar cortex and deep cerebellar nuclei. Neuroscience. 51:719-728.
- Ikemoto, S. Panksepp, J. (1994) The relationship between self-stimulation and sniffing in rats: does a common brain system mediate these behaviors? Behav Brain Res. 61:143-162.
- Imai, T. Sakano, H. (2007) Roles of odorant receptors in projecting axons in the mouse olfactory system. Curr Opin Neurobiol. 17:507-515.

- Inaki, K. Takahashi, Y.K. Nagayama, S. Mori, K. (2002) Molecular-feature domains with posterodorsal-anteroventral polarity in the symmetrical sensory maps of the mouse olfactory bulb: mapping of odourant-induced Zif268 expression. Eur J Neurosci. 15:1563-1574.
- Isaacson, J.S. Strowbridge, B.W. (1998) Olfactory reciprocal synapses: dendritic signaling in the CNS.Neuron. 20:749-761.
- Isaacson, J.S. Vitten, H. (2003) GABA(B) receptors inhibit dendrodendritic transmission in the rat olfactory bulb. J Neurosci. 23:2032-2039.
- Ishikawa, S. Nakayama, T. Watanabe, M. Matsuzawa, T. (2009) Flow mechanisms in the human olfactory groove: numerical simulation of nasal physiological respiration during inspiration, expiration, and sniffing. Arch Otolaryngol Head Neck Surg. 135:156-162.

J

- Jahr, C.E. Nicoll, R.A. (1981) Primary afferent depolarization in the in vitro frog olfactory bulb. J Physiol. 318:375-384.
- Jahr, C.E. Nicoll, R.A. (1982a) Noradrenergic modulation of dendrodendritic inhibition in the olfactory bulb. Nature. 297:227-229.
- Jahr, C.E. Nicoll, R.A. (1982b) An intracellular analysis of dendrodendritic inhibition in the turtle in vitro olfactory bulb. J Physiol. 326:213-234.
- Jiang, M. Griff, E.R. Ennis, M. Zimmer, L.A. Shipley, M.T. (1996) Activation of locus coeruleus enhances the responses of olfactory bulb mitral cells to weak olfactory nerve input. J Neurosci. 16:6319-6329.
- Jiang, J. Zhao, K. (2010) Airflow and nanoparticle deposition in rat nose under various breathing and sniffing conditions: a computational evaluation of the unsteady effect. J Aerosol Sci. 41:1030-1043.
- ohnson, B.A. Ho, S.L. Xu, Z. Yihan, J.S. Yip, S. Hingco, E.E. Leon, M. (2002) Functional mapping of the rat olfactory bulb using diverse odorants reveals modular responses to functional groups and hydrocarbon structural features. J Comp Neurol. 449:180-194.
- Johnson, B.A. Leon, M. (2000) Modular representations of odorants in the glomerular layer of the rat olfactory bulb and the effects of stimulus concentration. J Comp Neurol. 422:496-509.
- JJohnson, B.A. Woo, C.C. Hingco, E.E. Pham, K.L. Leon, M. (1999) Multidimensional chemotopic responses to n-aliphatic acid odorants in the rat olfactory bulb. J Comp Neurol. 409:529-548.
- Johnson, B.A. Woo, C.C. Zeng, Y. Xu, Z. Hingco, E.E. Ong, J. Leon, M. (2010) Prolonged stimulus exposure reveals prolonged neurobehavioral response patterns. J Comp Neurol. 518:1617-1629.
- Johnson, B.N. Mainland, J.D. Sobel, N. (2003) Rapid olfactory processing implicates subcortical control of an olfactomotor system. J Neurophysiol. 90:1084-1094.

- Jourdan, F. (1982) Spatial dimension in olfactory coding: a representation of the 2-deoxyglucose patterns of glomerular labeling in the olfactory bulb. Brain Res. 240:341-344.
- Jourdan, F. Duveau, A. Astic, L. Holley, A. (1980) Spatial distribution of [14C]2-deoxyglucose uptake in the olfactory bulbs of rats stimulated with two different odours. Brain Res. 188:139-154.

K

- Kashiwadani, H. Sasaki, Y.F. Uchida, N. Mori, K. (1999) Synchronized oscillatory discharges of mitral/tufted cells with different molecular receptive ranges in the rabbit olfactory bulb. J Neurophysiol. 82:1786-1792.
- Kauer, J.S. (1981) Olfactory receptor cell staining using horseradish peroxidase. Anat Rec. 200:331-336.
- Kauer, J.S. Moulton, D.G. (1974) Responses of olfactory bulb neurones to odour stimulation of small nasal areas in the salamander. J Physiol. 243:717-737.
- Kauer, J.S. Senseman, D.M. Cohen, L.B. (1987) Odor-elicited activity monitored simultaneously from 124 regions of the salamander olfactory bulb using a voltage-sensitive dye. Brain Res. 418:255-261.
- Kay, L.M. (2005) Thêta oscillations and sensorimotor performance. Proc Natl Acad Sci U S A. 102:3863-3868.
- Kay, L.M. Beshel, J. (2010) A beta oscillation network in the rat olfactory system during a 2-alternative choice odor discrimination task. J Neurophysiol. 104:829-839.
- Kay, L.M. Beshel, J. Brea, J. Martin, C. Rojas-Líbano, D. Kopell, N. (2009) Olfactory oscillations: the what, how and what for. Trends Neurosci. 32:207-214.
- Kay, L.M. Laurent, G. (1999) Odor- and context-dependent modulation of mitral cell activity in behaving rats. Nat Neurosci. 2:1003-1009.
- Kelemen, G. (1947) The junction of the nasal cavity and the pharyngeal tube in the rat. Arch Otolaryngol. 45(2):159-168.
- Kelly, J.T. Prasad, A.K. Wexler, A.S. (2000) Detailed flow patterns in the nasal cavity. J Appl Physiol. 89:323-337.
- Kent, P.F. Mozell, M.M. (1992) The recording of odorant-induced mucosal activity patterns with a voltage-sensitive dye. J Neurophysiol. 68:1804-1819.
- Kent, P.F. Mozell, M.M. Murphy, S.J. Hornung, D.E. (1996) The interaction of imposed and inherent olfactory mucosal activity patterns and their composite representation in a mammalian species using voltage-sensitive dyes. J Neurosci. 16:345-353.
- Kepecs, A. Uchida, N. Mainen, Z.F. (2006) The sniff as a unit of olfactory processing. Chem Senses. 2006 31 : 161-179.

- Kepecs, A. Uchida, N. Mainen, Z.F. (2007) Rapid and precise control of sniffing during olfactory discrimination in rats.J Neurophysiol. 98:205-213
- Keyhani, K. Scherer, P.W. Mozell, M.M. (1997) A numerical model of nasal odorant transport for the analysis of human olfaction. J Theor Biol. 186:279-301.
- Khan, A.G. Parthasarathy, K. Bhalla, U.S. (2010) Odor representations in the mammalian olfactory bulb. Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med. 2:603-611.
- Khan, A.G. Sarangi, M. Bhalla, U.S. (2012) Rats track odour trails accurately using a multi-layered strategy with near-optimal sampling. Nat Commun. 3:703.
- Khan, A.G. Thattai, M. Bhalla, U.S. (2008) Odor representations in the rat olfactory bulb change smoothly with morphing stimuli. Neuron. 2008 57:571-585.
- Kimbell, J.S. Godo, M.N. Gross, E.A. Joyner, D.R. Richardson, R.B. Morgan, K.T. (1997) Computer simulation of inspiratory airflow in all regions of the F344 rat nasal passages. Toxicol Appl Pharmacol. 145:388-398.
- Kleemann, A.M. Kopietz, R. Albrecht, J. Schöpf, V. Pollatos, O. Schreder, T. May, J. Linn, J. Brückmann, H. Wiesmann, M. (2009) Investigation of breathing parameters during odor perception and olfactory imagery. Chem Senses. 34:1-9.
- Kleene, S.J. (2008) The electrochemical basis of odor transduction in vertebrate olfactory cilia. Chem Senses. 33:839-859.
- Koehl, M.A.R. (2006) The fluid mechanics of arthropod sniffing in turbulent odor plumes. Chem Senses. 31:93-105.
- Komisaruk, B.R. (1970) Synchrony between limbic system thêta activity and rhythmical behavior in rats. J Comp Physiol Psychol. 70:482-492.
- Kosaka, T. Kosaka, K. (2011) "Interneurons" in the olfactory bulb revisited. Neurosci Res. 69:93-99.

L

- Lagier, S. Carleton, A. Lledo, P.M. (2004) Interplay between local GABAergic interneurons and relay neurons generates gamma oscillations in the rat olfactory bulb. J Neurosci. 24:4382-4392.
- Laing, D.G. (1983) Natural sniffing gives optimum odour perception for humans. Perception. 12:99-117.
- Laing, D.G. (1986) Identification of single dissimilar odors is achieved by humans with a single sniff. Physiol Behav. 37:163-170.
- Laurent, G. (2002) Olfactory network dynamics and the coding of multidimensional signals.Nat Rev Neurosci. 3:884-895.

- Laurent, G. Davidowitz, H. (1994) Encoding of olfactory information with oscillating neural assemblies. Science. 265:1872-1875.
- Laurent, G. Stopfer, M. Friedrich, R.W. Rabinovich, M.I. Volkovskii, A. Abarbanel, H.D. (2001) Odor encoding as an active, dynamical process: experiments, computation, and theory. Annu Rev Neurosci. 24:263-297.
- Lecoq, J. Tiret, P. Charpak, .S (2009) Peripheral adaptation codes for high odor concentration in glomeruli. J Neurosci. 29:3067-3072.
- 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.
- Lehmkuhle, M.J. Normann, R.A. Maynard, E.M. (2006) Trial-by-trial discrimination of three enantiomer pairs by neural ensembles in mammalian olfactory bulb. J Neurophysiol. 95:1369-1379.
- Le Magnen, J. (1944) J. Étude des facteurs dynamiques de l'excitation olfactive. In: L'année psychologique. vol. 45-46.
- Leung, L.S. (1984) Pharmacology of thêta phase shift in the hippocampal CA1 region of freely moving rats.Electroencephalogr Clin Neurophysiol. 58:457-466.
- Lin, D.Y. Shea, S.D. Katz, L.C. (2006) Representation of natural stimuli in the rodent main olfactory bulb. Neuron. 50:937-949.
- Linster, C. Cleland, T.A. (2009) Glomerular microcircuits in the olfactory bulb. Neural Netw. 22:1169-1173.
- Lisberger, S.G. Sejnowski, T.J. (1992) Motor learning in a recurrent network model based on the vestibulo-ocular reflex. Nature. 360:159-161.
- Litaudon, P. Amat, C. Bertrand, B. Vigouroux, M. Buonviso, N. (2003) Piriform cortex functional heterogeneity revealed by cellular responses to odours. Eur J Neurosci. 17:2457-2461.
- Litaudon, P. Garcia, S. Buonviso, N. (2008) Strong coupling between pyramidal cell activity and network oscillations in the olfactory cortex. Neuroscience. 156:781-7.
- Liu, W.L. Shipley, M.T. (1994) Intrabulbar associational system in the rat olfactory bulb comprises cholecystokinin-containing tufted cells that synapse onto the dendrites of GABAergic granule cells. J Comp Neurol. 346:541-558.
- Loudon, C. Koehl, M.A. (2000) Sniffing by a silkworm moth: wing fanning enhances air penetration through and pheromone interception by antennae. J Exp Biol. 203:2977-2990.
- Luiten, P.G. ter Horst, G.J. Karst, H. Steffens, A.B. (1985) The course of paraventricular hypothalamic efferents to autonomic structures in medulla and spinal cord. Brain Res. 329:374-378.

- Luna, V.M. Schoppa, N.E. (2008) GABAergic circuits control input-spike coupling in the piriform cortex. J Neurosci. 28:8851-8859.
- Luo, M. Katz, L.C. (2001) Response correlation maps of neurons in the mammalian olfactory bulb. Neuron. 32:1165-1179.

M

- Ma, L. Michel, W.C. (1998) Drugs affecting phospholipase C-mediated signal transduction block the olfactory cyclic nucleotide-gated current of adult zebrafish. J Neurophysiol. 79:1183-1192.
- Macrides, F. Chorover, S.L. (1972) Olfactory bulb units: activity correlated with inhalation cycles and odor quality. Science. 175:84-87.
- Macrides, F. Eichenbaum, H.B. Forbes, W.B. (1982) Temporal relationship between sniffing and the limbic thêta rhythm during odor discrimination reversal learning. J Neurosci. 2:1705-1717.
- Macrides, F. Schneider, S.P. (1982) Laminar organization of mitral and tufted cells in the main olfactory bulb of the adult hamster. J Comp Neurol. 208:419-430.
- Mainen, Z.F. (2006) Behavioral analysis of olfactory coding and computation in rodents. Curr Opin Neurobiol. 16:429-434.
- Mainland, J.D. Johnson, B.N. Khan, R. Ivry, R.B. Sobel, N. (2005) Olfactory impairments in patients with unilateral cerebellar lesions are selective to inputs from the contralesional nostril. J Neurosci. 25 :6362-6371.
- Mainland, J. Sobel, N. (2006) The sniff is part of the olfactory percept. Chem senses. 31:181-196.
- Malnic, B. Hirono, J. Sato, T. Buck, L.B. (1999) Combinatorial receptor codes for odors. Cell. 96:713-723.
- Marchand, J.E. Hagino, N. (1983) Afferents to the periaqueductal gray in the rat. A horseradish peroxidase study. Neuroscience. 9:95-106.
- Margrie, T.W. Schaefer, A.T. (2003) Thêta oscillation coupled spike latencies yield computational vigour in a mammalian sensory system.J Physiol. 546:363-374.
- Martin, C. Beshel, J. Kay, L.M. (2007) An olfacto-hippocampal network is dynamically involved in odor-discrimination learning.J Neurophysiol. 98:2196-2205.
- Martin, C. Gervais, R. Hugues, E. Messaoudi, B. Ravel, N. (2004) Learning modulation of odor-induced oscillatory responses in the rat olfactory bulb: a correlate of odor recognition?. J Neurosci. 24:389-397.

- Martin, C. Gervais, R. Messaoudi, B. Ravel, N. (2006) Learning-induced oscillatory activities correlated to odour recognition: a network activity. Eur J Neurosci. 23:1801-1810.
- Matsutani, S. (2010) Trajectory and terminal distribution of single centrifugal axons from olfactory cortical areas in the rat olfactory bulb. Neuroscience. 169:436-448.
- McLean, J.H. Shipley, M.T. (1987) Serotonergic afferents to the rat olfactory bulb: II. Changes in fiber distribution during development. J Neurosci. 7:3029-3039.
- Mezler, M. Fleischer, J. Breer, H. (2001a) Characteristic features and ligand specificity of the two olfactory receptor classes from Xenopus laevis. J Exp Biol. 204:2987-2997.
- Mezler, M. Fleischer, J. Conzelmann, S. Korchi, A. Widmayer, P. Breer, H. Boekhoff, I. (2001b) Identification of a nonmammalian Golf subtype: functional role in olfactory signaling of airborne odorants in Xenopus laevis. J Comp Neurol. 439:400-410.
- Millery, J. Briand, L. Bézirard, V. Blon, F. Fenech, C. Richard-Parpaillon, L. Quennedey, B. Pernollet, J. Gascuel, J. (2005) Specific expression of olfactory binding protein in the aerial olfactory cavity of adult and developing Xenopus. Eur J Neurosci. 22:1389-1399.
- Miyamichi, K. Serizawa, S. Kimura, H.M. Sakano, H. (2005) Continuous and overlapping expression domains of odorant receptor genes in the olfactory epithelium determine the dorsal/ventral positioning of glomeruli in the olfactory bulb. J Neurosci. 25:3586-3592.
- Mombaerts, P. Wang, F. Dulac, C. Chao, S.K. Nemes, A. Mendelsohn, M. Edmondson, J. Axel, R. (1996) Visualizing an olfactory sensory map. Cell. 87:675-686.
- Monod, B. Mouly, A.M. Vigouroux, M. Holley, A. (1989) An investigation of some temporal aspects of olfactory coding with the model of multi-site electrical stimulation of the olfactory bulb in the rat. Behav Brain Res. 33:51-63.
- Mori, K. (1995) Relation of chemical structure to specificity of response in olfactory glomeruli. Curr Opin Neurobiol. 5:467-474.
- Mori, K. Kishi, K. Ojima, H. (1983) Distribution of dendrites of mitral, displaced mitral, tufted, and granule cells in the rabbit olfactory bulb. J Comp Neurol. 219:339-355.
- Moruzzi, G. (1940) Paleocerebellar inhibition of vasomotor and respiratory carotid sinus reflexes. J. Neurophysiol. 3: 20–32.
- Moulton, D.G. (1976) Spatial patterning of response to odors in the peripheral olfactory system. Physiol Rev. 56:578-593.
- Moulton, D.G. Marshall, D.A. (1976) The performance of dogs in detecting α-ionone in the vapor phase. J Comp Physiol. 110:287-306.
- Moulton, D.G. Tucker, D. (1964) Electrophysiology of the olfactory system. Ann N Y Acad Sci 116:380-428.
- Mouret, A. Murray, K. Lledo, P.M. (2009) Centrifugal drive onto local inhibitory interneurons of the olfactory bulb. Ann N Y Acad Sci. 1170:239-254.

- Mozell, M.M. (1964a) Olfactory Discrimination: Electrophysiological Spatiotemporal Basis. Science. 143:1336-1337.
- Mozell, M.M. (1964b) Evidence for sorption as a mechanism of the olfactory analysis of vapours. Nature. 203:1181-1182.
- Mozell, M.M. (1966) The spatiotemporal analysis of odorants at the level of the olfactory receptor sheet. J Gen Physiol. 50:25-41.
- Mozell, M.M. (1970) Evidence for a chromatographic model of olfaction. J Gen Physiol 56:46-63.
- Mozell, M.M. Jagodowicz, M (1973) Chromatographic separation of odorants by the nose: retention times measured across in vivo olfactory mucosa. Science. 181:1247-1249.
- Murphy, G.J. Darcy, D.P. Isaacson, J.S. (2005) Intraglomerular inhibition: signaling mechanisms of an olfactory microcircuit. Nat Neurosci. 8:354-364.
- Murthy, V.N. (2011) Olfactory maps in the brain. Annu Rev Neurosci. 34:233-258.
- Mustaparta, H. (1971) Spatial distribution of receptor-responses to stimulation with different odours. Acta Physiol Scand. 82:154-166.

N

- Nagao, H. Yamaguchi, M. Takahash, Y. Mori, K. (2002) Grouping and representation of odorant receptors in domains of the olfactory bulb sensory map. Microsc Res Tech. 58:168-175.
- Nagashima, A. Touhara, K. (2010) Enzymatic conversion of odorants in nasal mucus affects olfactory glomerular activation patterns and odor perception. J Neurosci. 30:16391-16398.
- Nagayama, S. Enerva, A. Fletcher, M.L. Masurkar, A.V. Igarashi, K.M. Mori, K. Chen, W.R. (2010) Differential axonal projection of mitral and tufted cells in the mouse main olfactory system. Front Neural Circuits. 4:120.
- Najac, M. De Saint Jan, D. Reguero, L. Grandes, P. Charpak, S. (2011) Monosynaptic and polysynaptic feed-forward inputs to mitral cells from olfactory sensory neurons. J Neurosci. 31:8722-8729.
- Nef, P. Hermans-Borgmeyer, I. Artières-Pin, H. Beasley, L. Dionne, V.E. Heinemann, S.F. (1992) Spatial pattern of receptor expression in the olfactory epithelium. Proc Natl Acad Sci U S A. 89:8948-8952.
- Neuhaus, W. (1981) Die Bedeutung des Schnfiffelns fuer das Riechen des Hundes « l'importance du flairage pour la perception olfactive chez le chien », Z. Srugetier. 46 : 301-310.
- Neville, K.R. Haberly, L.B. (2003) Beta and gamma oscillations in the olfactory system of the urethane-anesthetized rat. J Neurophysiol. 90:3921-3930.
- Nicoll, R.A. Jahr, C.E. (1982) Self-excitation of olfactory bulb neurones. Nature. 296:441-444.

O

- Oka, Y. Takai, Y. Touhara, K. (2009) Nasal airflow rate affects the sensitivity and pattern of glomerular odorant responses in the mouse olfactory bulb. J Neurosci. 29:12070-12078.
- Onoda, N. Mori, K. (1980) Depth distribution of temporal firing patterns in olfactory bulb related to air-intake cycles. J Neurophysiol. 44:29-39.
- Orona, E. Rainer, E.C. Scott, J.W. (1984) Dendritic and axonal organization of mitral and tufted cells in the rat olfactory bulb. J Comp Neurol. 226:346-356.
- Orona, E. Scott, J.W. Rainer, E.C. (1983) Different granule cell populations innervate superficial and deep regions of the external plexiform layer in rat olfactory bulb. J Comp Neurol. 217:227-237.
- Ottoson, D. (1955) Analysis of the electrical activity of the olfactory epithelium. Acta Physiol Scand Suppl. 35:1-83.

P

- Pager, J. (1985) Respiration and olfactory bulb unit activity in the unrestrained rat: statements and reappraisals.Behav Brain Res. 16:81-94.
- Palouzier-Paulignan, B. Duchamp-Viret, P. Hardy, A.B. Duchamp, A. (2002) GABA(B) receptor-mediated inhibition of mitral/tufted cell activity in the rat olfactory bulb: a whole-cell patch-clamp study in vitro. Neuroscience. 111:241-250.1
- Pandipati, S. Gire, D.H. Schoppa, N.E. (2010) Adrenergic receptor-mediated disinhibition of mitral cells triggers long-term enhancement of synchronized oscillations in the olfactory bulb. J Neurophysiol. 104:665-674.
- Panzanelli, P. Homanics, G.E. Ottersen, O.P. Fritschy, J.M. Sassoè-Pognetto, M. (2004) Pre- and postsynaptic GABA receptors at reciprocal dendrodendritic synapses in the olfactory bulb. Eur J Neurosci. 20:2945-2952.
- Petersen, C.C.H. (2007) The functional organization of the barrel cortex. Neuron. 56:339-355.
- Philipps, C.G. Powell, T.P.S. Shepherd, G.M. (1963) Responses of mitral cells to stimulation of the lateral ,olfactory tract in the rabbit. J physiol. 169:65-88.
- Phillips, M.E. Sachdev, R.N. Willhite, D.C. Shepherd, G.M. (2012) Respiration drives network activity and modulates synaptic and circuit processing of lateral inhibition in the olfactory bulb. J Neurosci. 32:85-98.
- Philpot, B.D. Lyders, E.M. Brunjes, P.C. (1998) The NMDA receptor participates in respiration-related mitral cell synchrony. Exp Brain Res. 118:205-209.

- Pinching, A.J. Powell, T.P. (1971a) The neuropil of the periglomerular region of the olfactory bulb. J Cell Sci. 9:379-409.
- Pinching, A.J. Powell, T.P. (1971b) The neuropil of the glomeruli of the olfactory bulb. J Cell Sci. 9:347-377.
- Pinching, A.J. Powell, T.P. (1971c) The neuron types of the glomerular layer of the olfactory bulb. J Cell Sci. 9:305-345.
- Pinching, A.J. Powell, T.P. (1972a) The termination of centrifugal fibres in the glomerular layer of the olfactory bulb. J cell Sci. 10: 621-635.
- Pinching, A.J. Powell, T.P. (1972b) Experimental studies on the axons intrinsic to the glomerular layer of the olfactory bulb. J Cell Sci. 10:637-655.
- Pírez, N. Wachowiak, M. (2008) In vivo modulation of sensory input to the olfactory bulb by tonic and activity-dependent presynaptic inhibition of receptor neurons. J Neurosci. 28:6360-6371.
- Potter, H. Chorover, S.L. (1976) Response plasticity in hamster olfactory bulb: peripheral and central processes. Brain Res. 116:417-429.
- Poulet, J.F.A. Petersen, C.C.H. (2008) Internal brain state regulates membrane potential synchrony in barrel cortex of behaving mice. Nature. 454:881-885.
- Price, J.L. Powell, T.P. (1970a) The mitral and short axon cells of the olfactory bulb. J Cell Sci. 7:631-651.
- Price, J.L. Powell, T.P. (1970b) The morphology of the granule cells of the olfactory bulb. J Cell Sci. 7:91-123.
- Price, J.L. Powell, T.P. (1970c) The synaptology of the granule cells of the olfactory bulb. J Cell Sci. 7:125-155.
- Price, J.L. Powell, T.P. (1970d) An experimental study of the origin and the course of the centrifugal fibres to the olfactory bulb in the rat.J Anat. 107:215-237.
- Price, J.L. Powell, T.P. (1971) Certain observations on the olfactory pathway. J Anat. 110:105-126.
- Price, J.L. (1987) The central olfactory and accessory olfactory system. Offprints from Neurobiology of taste and smell. Chapter eight.
- Proetz, A.W. (1941) Applied Physiology of the Nose. Annals Publishing Co.,St Louis, MO.
- Proetz, A.W. (1951) Air currents in the upper respiratory tract and their clinical importance. Ann Otol Rhinol Laryngol. 60:439-467.

Q

- Quirk, M.C. Sosulski, D.L. Feierstein, C.E. Uchida, N. Mainen, Z.F. (2009) A defined network of fast-spiking interneurons in orbitofrontal cortex: responses to behavioral contingencies and ketamine administration. Front Syst Neurosci. 3:13.

R

- Rall, W. Shepherd, G.M. (1968) Theoretical reconstruction of field potentials and dendrodendritic synaptic interactions in olfactory bulb. J Neurophysiol. 31:884-915.
- Rall, W. Shepherd, G.M. Reese, T.S. Brightman, M.W. (1966) Dendrodendritic synaptic pathway for inhibition in the olfactory bulb. Exp Neurol. 14:44-56.
- Raming, K. Konzelmann, S. Breer, H. (1998) Identification of a novel G-protein coupled receptor expressed in distinct brain regions and a defined olfactory zone. Receptors Channels. 6:141-151.
- Ramirez, J.M. Richter, D.W. (1996) The neuronal mechanisms of respiratory rhythm generation. Curr Opin Neurobiol. 6:817-825.
- Ravel, N. Caille, D. Pager, J. (1987) A centrifugal respiratory modulation of olfactory bulb unit activity: a study on acute rat preparation. Exp Brain Res. 65:623-628.
- Ravel, N. Chabaud, P. Martin, C. Gaveau, V. Hugues, E. Tallon-Baudry, C. Bertrand, O. Gervais, R. (2003) Olfactory learning modifies the expression of odour-induced oscillatory responses in the gamma (60-90 Hz) and beta (15-40 Hz) bands in the rat olfactory bulb.Eur J Neurosci. 17:350-358.
- Ravel, N. Pager, J. (1990) Respiratory patterning of the rat olfactory bulb unit activity: nasal versus tracheal breathing. Neurosci Lett. 115:213-218.
- Rehn, T. (1978) Perceived odor intensity as a function of air flow through the nose. Sens Processes. 2:198-205.
- Ressler, K.J. Sullivan, S.L. Buck, L.B. (1993) A zonal organization of odorant receptor 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 organized epitope map in the olfactory bulb. Cell. 79:1245-1255.
- Ribak, C.E. Vaughn, J.E. Saito, K. Barber, R. Roberts, E. (1977) Glutamate decarboxylase localization in neurons of the olfactory bulb. Brain Res. 126:1-18.
- Rinberg, D. Koulakov, A. Gelperin, A. (2006a) Sparse odor coding in awake behaving mice. J Neurosci. 26:8857-8865.
- Rinberg, D. Koulakov, A. Gelperin, A. (2006b) Speed-accuracy tradeoff in olfaction. Neuron. 51:351-358.

- Rojas-Líbano, D. Kay, L.M. (2008) Olfactory system gamma oscillations: the physiological dissection of a cognitive neural system. Cogn Neurodyn. 2:179-194.
- Rossi, J.3rd Panksepp, J. (1992) Analysis of the relationships between self-stimulation sniffing and brain-stimulation sniffing. Physiol Behav. 51:805-13.
- Roux, S.G. Cenier, T. Garcia, S. Litaudon, P. Buonviso, N. (2007) A wavelet-based method for local phase extraction from a multi-frequency oscillatory signal.J Neurosci Methods. 160:135-143.
- Roux, S.G. Garcia, S. Bertrand, B. Cenier, T. Vigouroux, M. Buonviso, N. Litaudon, P. (2006) Respiratory cycle as time basis: an improved method for averaging olfactory neural events. J Neurosci Methods. 152:173-178.
- Royet, J.P. Distel, H. Hudson, R. Gervais, R. (1998) A re-estimation of the number of glomeruli and mitral cells in the olfactory bulb of rabbit. Brain Res. 788:35-42.
- Royet, J.P. 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. 270:559-568.
- Rubin, B.D. Katz, L.C. (1999) Optical imaging of odorant representations in the mammalian olfactory bulb. Neuron. 23:499-511.

S

- Sallaz, M. Jourdan, F. (1993) C-fos expression and 2-deoxyglucose uptake in the olfactory bulb of odour-stimulated awake rats. Neuroreport. 4:55-58.
- Sane, S.P. Jacobson, N.P. (2006) Induced airflow in flying insects II. Measurement of induced flow. J Exp Biol. 209:43-56.
- Sassoé-Pognetto, M. Utvik, J.K. Camoletto, P. Watanabe, M. Stephenson, F.A. Bredt, D.S. Ottersen, O.P. (2003) Organization of postsynaptic density proteins and glutamate receptors in axodendritic and dendrodendritic synapses of the rat olfactory bulb. J Comp Neurol. 463:237-248.
- Schneider, S.P. Macrides, F. (1978) Laminar distributions of internuerons in the main olfactory bulb of the adult hamster. Brain Res Bull. 3:73-82.
- Schneider, S.P. Scott, J.W. (1983) Orthodromic response properties of rat olfactory bulb mitral and tufted cells correlate with their projection patterns. J Neurophysiol. 50:358-378.
- Schoenfeld, T.A. Clancy, A.N. Forbes, W.B. Macrides, F. (1994) The spatial organization of the peripheral olfactory system of the hamster. Part I: Receptor neuron projections to the main olfactory bulb. Brain Res Bull. 34:183-210.
- Schoenfeld, T.A. Cleland, T.A. (2005) The anatomical logic of smell. Trends Neurosci. 28:620-627.

- Schoenfeld, T.A. Cleland, T.A. (2006) Anatomical contributions to odorant sampling and representation in rodents: zoning in on sniffing behavior. Chem Senses. 31:131-144.
- Schoenfeld, T.A. Marchand, J.E. Macrides, F. (1985) Topographic organization of tufted cell axonal projections in the hamster main olfactory bulb: an intrabulbar associational system. J Comp Neurol. 235:503-518.
- Schoppa, N.E. Kinzie, J.M. Sahara, Y. Segerson, T.P. Westbrook, G.L. (1998) Dendrodendritic inhibition in the olfactory bulb is driven by NMDA receptors. J Neurosci. 18:6790-6802.
- Schoppa, N.E. Westbrook, G.L. (2001) Glomerulus-specific synchronization of mitral cells in the olfactory bulb. Neuron. 31:639-651.
- Schoppa, N.E. Westbrook, G.L. (2002) AMPA autoreceptors drive correlated spiking in olfactory bulb glomeruli. Nat Neurosci. 5:1194-1202.
- Schreider, J.P. Raabe, O.G. (1981) Anatomy of the nasal-pharyngeal airway of experimental animals. Anat Rec. 200:195-205.
- Scott, J.W. (1981) Electrophysiological identification of mitral and tufted cells and distributions of their axons in olfactory system of the rat. J Neurophysiol. 46:918-931.
- Scott, J.W. (2006) Sniffing and spatiotemporal coding in olfaction. Chem Senses. 31:119-130
- Scott, J.W. Acevedo, H.P. Sherrill, L. (2006) Effects of concentration and sniff flow rate on the rat electroolfactogram. Chem Senses. 31:581-593
- Scott, J.W. Scott-Johnson, P.E. (2002) The electroolfactogram: a review of its history and uses. Microsc Res Tech. 58:152-160.
- Scott-Johnson, P.E. Blakley, D. Scott, J.W. (2000) Effects of air flow on rat electroolfactogram. Chem Senses. 25:761-768.
- Shepherd, G.M. (2004) The synaptic organization of the brain, ISBN-10: 019515956X | ISBN-13: 978-0195159561 | Edition: 5
- Shepherd, G.M. (2011) The microcircuit concept applied to cortical evolution: from three-layer to six-layer cortex. Front Neuroanat. 5:30.
- Shepherd, G.M. Chen, W.R. Willhite, D. Migliore, M. Greer C.A. (2007) The olfactory granule cell: from classical enigma to central role in olfactory processing. Brain Res Rev. 55:373-382.
- Shipley, M.T. Ennis, M. (1996) Functional organization of olfactory system. J Neurobiol. 30:123-176.
- Shipley, M.T. McLean, J.H. Zimmer, L.A. Ennis, M. (1996) in Integrated systems of the CNS, part III, Edition (L.W. Swanson, a. Bjorklund and T. Hokfelt ed.), pp 469-575. Elsevier, New York.
- Shusterman, R. Smear, M.C. Koulakov, A.A. Rinberg, D. (2011) Precise olfactory responses tile the sniff cycle. Nat Neurosci. 14:1039-1044.
- Sicard, G. Holley, A. (1984) Receptor cell responses to odorants: similarities and differences among odorants. Brain Res. 292:283-296.

- Smear, M. Shusterman, R. O'Connor, R. Bozza, T. Rinberg, D. (2011) Perception of sniff phase in mouse olfaction. Nature. 479:397-400.
- Sobel, E.C. Tank, D.W. (1993) Timing of odor stimulation does not alter patterning of olfactory bulb unit activity in freely breathing rats. J Neurophysiol. 69:1331-1337.
- Sobel, N. Prabhakaran, V. Desmond, J.E. Glover, G.H. Goode, R.L. Sullivan, E.V. Gabrieli, J.D.E. (1998a) Sniffing and smelling: separate subsystems in the human olfactory cortex. Nature. 392:282-284.
- Sobel, N. Prabhakaran, V. Hartley, C.A. Desmond, J.E. Zhao, Z. Glover, G.H. Gabrieli, J.D. Sullivan, E.V. (1998b) Odorant-induced and sniff-induced activation in the cerebellum of the human. J Neurosci. 18:8990-9001.
- Sobel, N. Thomason, M.E. Stappen, I. Tanner, C.M. Tetrud, J.W. Bower, J.M. Sullivan, E.V. Gabrieli, J.D. (2001) An impairment in sniffing contributes to the olfactory impairment in Parkinson's disease. Proc Natl Acad Sci U S A. 98:4154-4159.
- Sosulski, D.L. Bloom, M.L. Cutforth, T. Axel, R. Datta, S.R (2011) Distinct representations of olfactory information in different cortical centres. Nature. 472:213-216.
- Spors, H. Grinvald, A. (2002) Spatio-temporal dynamics of odor representations in the mammalian olfactory bulb. Neuron. 34:301-315.
- Spors, H. Wachowiak, M. Cohen, L.B. Friedrich, R.W. (2006) Temporal dynamics and latency patterns of receptor neuron input to the olfactory bulb. J Neurosci. 26:1247-1259.
- Strotmann, J. Wanner, I. Helfrich, T. Beck, A. Breer, H. (1994) Rostro-caudal patterning of receptor-expressing olfactory neurones in the rat nasal cavity. Cell Tissue Res. 278:11-20.
- Strowbridge, B.W. (2009) Role of cortical feedback in regulating inhibitory microcircuits. Ann N Y Acad Sci. 1170:270-274.

T

- Tallon-Baudry, C. Kreiter, A. Bertrand, O. (1999) Sustained and transient oscillatory responses in the gamma and beta bands in a visual short-term memory task in humans. Vis Neurosci. 16:449-459.
- Teghtsoonian, R. Teghtsoonian, M. (1982) Perceived effort in sniffing: the effects of sniff pressure and resistance. Percept Psychophys. 31:324-329.
- Teghtsoonian, R. Teghtsoonian, M. Berglund, B. Berglund, U. (1978) Invariance of odor strength with sniff vigor: an olfactory analogue to size constancy. J Exp Psychol Hum Percept Perform. 4:144-152.
- Tegoni, M. Pelosi, P. Vincent, F. Spinelli, S. Campanacci, V. Grolli, S. Ramoni, R. Cambillau, C. (2000) Mammalian odorant binding proteins. Biochim Biophys Acta. 1482:229-240.

- Teichner, W.H. (1966) A method for studying olfaction in the unrestrained rat. J Psychol. 63:291-297
- Toida, K. Kosaka, K. Aika, Y. Kosaka, T. (2000) Chemically defined neuron groups and their subpopulations in the glomerular layer of the rat main olfactory bulb--IV. Intraglomerular synapses of tyrosine hydroxylase-immunoreactive neurons. Neuroscience. 101:11-17.
- Toida, K. Kosaka, K. Heizmann, C.W. Kosaka, T. (1998) Chemically defined neuron groups and their subpopulations in the glomerular layer of the rat main olfactory bulb: III. Structural features of calbindin D28K-immunoreactive neurons. J Comp Neurol. 392:179-198.
- Tripathy, S.J. Peters, O.J. Staudacher, E.M. Kalwar, F.R. Hatfield, M.N. Daly, K.C. (2010) Odors Pulsed at Wing Beat Frequencies are Tracked by Primary Olfactory Networks and Enhance Odor Detection. Front Cell Neurosci. 4:1.
- Tsai, H.C. Zhang, F. Adamantidis, A. Stuber, G.D. Bonci, A. de Lecea, L. Deisseroth, K. (2009) Phasic firing in dopaminergic neurons is sufficient for behavioral conditioning. Science. 24:1080-1084.
- Tsuno, Y. Kashiwadani, H. Mori, K. (2008) Behavioral state regulation of dendrodendritic synaptic inhibition in the olfactory bulb. J Neurosci. 28:9227-9238.

U

- Uchida, N. Mainen, Z.F. (2003) Speed and accuracy of olfactory discrimination in the rat. Nat Neurosci. 6:1224-1229.
- Uchida, N. Takahashi, Y.K. Tanifuji, M. Mori, K. (2000) Odor maps in the mammalian olfactory bulb: domain organization and odorant structural features. Nat Neurosci. 3:1035-1043.
- Ueki, S. Domino, E.F. (1961) Some evidence for a mechanical receptor in olfactory function. J Neurophysiol. 24:12-25.

V

- Vanderwolf, C.H. (1969) Hippocampal electrical activity and voluntary movement in the rat. Electroencephalogr Clin Neurophysiol. 26:407-418.
- Vanderwolf, C.H. (1992) Hippocampal activity, olfaction, and sniffing: an olfactory input to the dentate gyrus. Brain Res. 593:197-208.
- Vanderwolf, C.H. (2001) The hippocampus as an olfacto-motor mechanism: were the classical anatomists right after all? Behav Brain Res. 127:25-47.
- Vassar, R. Chao, S.K. Sitcheran, R. Nuñez, J.M. Vosshall, L.B. Axel, R. (1994) Topographic organization of sensory projections to the olfactory bulb. Cell. 79:981-991.

- Vassar, R. Ngai, J. Axel, R. (1993) Spatial segregation of odorant receptor expression in the mammalian olfactory epithelium. Cell. 74:309-318.
- Verhagen, J.V. Wesson, D.W. Netoff, T.I. White, J.A. Wachowiak, M. (2007) Sniffing controls an adaptive filter of sensory input to the olfactory bulb. Nat Neurosci. 10:631-639.

W

- Wachowiak, M. Cohen, L.B. (1999) Presynaptic inhibition of primary olfactory afferents mediated by different mechanisms in lobster and turtle. J Neurosci. 19:8808-8817.
- Wachowiak, M. Shipley, M.T. (2006) Coding and synaptic processing of sensory information in the glomerular layer of the olfactory bulb. Semin Cell Dev Biol. 17:411-423.
- Walker, J.K. Lawson, B.L. Jennings, D.B. (1997) Breath timing, volume and drive to breathe in conscious rats: comparative aspects. Respir Physiol. 107:241-50.
- Walsh, R.R. (1956) Single spike activity in the olfactory bulb. Ann J Physiol. 186:631-639.
- Waranch, H.R. Terman, M. (1975) Control of the rat's sniffing behavior by response-independent and dependent schedules of reinforcing brain stimulation. Physiol Behav. 15:365-372.
- Watabe-Uchida, M. Zhu, L. Ogawa, S.K. Vamanrao, A. Uchida, N. (2012) Whole-brain mapping of direct inputs to midbrain dopamine neurons. Neuron. 74 :858-873
- Welker, W.I. (1964) Analysis of sniffing in the albino rat. Behavior. 22: 223–244.
- Wellis, D.P. Scott, J.W. (1990) Intracellular responses of identified rat olfactory bulb interneurons to electrical and odor stimulation. J Neurophysiol. 64:932-947.
- Wellis, D.P. Scott, J.W. Harrison, T.A. (1989) Discrimination among odorants by single neurons of the rat olfactory bulb. J Neurophysiol. 61: 1161-1177.
- Wesson, D.W. Carey, R.M. Verhagen, J.V. Wachowiak, M. (2008a) Rapid encoding and perception of novel odors in the rat. PLoS Biol. 6:e82.
- Wesson, D.W. Donahou, T.N. Johnson, M.O. Wachowiak, M. (2008b) Sniffing behavior of mice during performance in odor-guided tasks. Chem Senses. 33:581-596.
- Wesson, D.W. Verhagen, J.V. Wachowiak, M. (2009) Why sniff fast? The relationship between sniff frequency, odor discrimination, and receptor neuron activation in the rat. J Neurophysiol. 101:1089-1102.
- Wikgren, J. Nokia, M.S. Penttonen, M. (2010) Hippocampo-cerebellar thêta band phase synchrony in rabbits.Neuroscience. 165:1538-1545.

- Wilson, D.A. (1998) Habituation of odor responses in the rat anterior piriform cortex.J Neurophysiol. 79:1425-1440.
- Wilson, R.C. Steward, O. (1978) Polysynaptic activation of the dentate gyrus of the hippocampal formation: an olfactory input via the lateral entorhinal cortex. Exp Brain Res. 33:523-534.
- Woolley, D.E. Timiras, P.S. (1965) Prepyriform electrical activity in the rat during high altitude exposure. Electroencephalogr Clin Neurophysiol. 18:680-690.
- Woolsey, T.A. Van der Loos, H. (1970) The structural organization of layer IV in the somatosensory region (SI) of mouse cerebral cortex. The description of a cortical field composed of discrete cytoarchitectonic units. Brain Res. 17:205-242.

Y

- Yang, G.C. Scherer, P.W. Mozell, M.M. (2007) Modeling inspiratory and expiratory steady state velocity fields in the Sprague Dawley rat nasal cavity. Chem Senses. 32:215-223.
- Yokoi, M. Mori, K. Nakanishi, S. (1995) Refinement of odor molecule tuning by dendrodendritic synaptic inhibition in the olfactory bulb. Proc Natl Acad Sci U S A. 92:3371-3375.
- Yoshihara, Y. Mori, K. (1997) Basic principles and molecular mechanisms of olfactory axon pathfinding. Cell Tissue Res. 290:457-463.
- Youngentob, S.L. Mozell, M.M. Sheehe, P.R. Hornung, D.E. (1987) A quantitative analysis of sniffing strategies in rats performing odor detection tasks. Physiol Behav. 41:59-69.

Z

- Zhang, C. Restrepo, D. (2003) Heterogeneous expression of connexin 36 in the olfactory epithelium and glomerular layer of the olfactory bulb. J Comp Neurol. 459:426-439.
- Zhang, X. Firestein, S. (2002) The olfactory receptor gene superfamily of the mouse. Nat Neurosci. 5:124-133.

6 ANNEXES

6.1 Articles en second auteur

Stability of fast oscillations in the mammalian olfactory bulb: experiments and modeling.Fourcaud-Trocmé N, **Courtiol E**, Buonviso N, Voegtlin T.J Physiol Paris. 105(1-3):59-70 (2011)

Puis,

Faster, deeper, better: the impact of sniffing modulation on bulbar olfactory processing.
Esclassan F, **Courtiol E**, Thévenet M, Garcia S, Buonviso N, Litaudon P.
PLoS One. 7(7):e40927 (2012)

Journal of Physiology - Paris 105 (2011) 59–70

Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Physiology - Paris

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jphysparis

Stability of fast oscillations in the mammalian olfactory bulb: Experiments and modeling

Nicolas Fourcaud-Trocmé [a,b,c,d,*], Emmanuelle Courtiol [a,b,c,d], Nathalie Buonviso [a,b,c,d], Thomas Voegtlin [e]

[a] INSERM, U1028, Lyon Neuroscience Research Center, Olfactory Coding and Memory Team, Lyon F-69000, France
[b] CNRS, UMR5292, Lyon Neuroscience Research Center, Olfactory Coding and Memory Team, Lyon F-69000, France
[c] University Lyon, Lyon F-69000, France
[d] University Lyon 1, Villeurbanne F-69000, France
[e] INRIA Lorraine, Equipe Cortex, Vandoeuvre-les-Nancy F-54506, France

ARTICLE INFO

Keywords:
Olfactory bulb
Beta oscillations
Gamma oscillations
Model
Rat
Graded inhibition

ABSTRACT

In the rat olfactory bulb (OB), fast oscillations of the local field potential (LFP) are observed during the respiratory cycle. Gamma-range oscillations (40–90 Hz) occur at the end of inspiration, followed by beta-range oscillations (15–30 Hz) during exhalation. These oscillations are highly stereotypical, and their frequencies are stable under various conditions. In this study, we investigate the effect of stimulus intensity on activity in the OB. Using a double-cannulation protocol, we showed that although the frequency of the LFP oscillation does depend on the respiratory cycle phase, it is relatively independent of the intensity of odorant stimulation. In contrast, we found that the individual firing rate of mitral OB cells dramatically changed with the intensity of the stimulation. This suggests that OB fast oscillation parameters, particularly frequency, are fully determined by intrinsic OB network parameters. To test this hypothesis, we explored a model of the OB where fast oscillations are generated by the interplay between excitatory mitral/tufted cells and inhibitory granule cells with graded inhibition. We found that our model has two distinct activity regimes depending on the amount of noise. In a low-noise regime, the model displays oscillation in the beta range with a stable frequency across a wide range of excitatory inputs. In a high-noise regime, the model displays oscillatory dynamics with irregular cell discharges and fast oscillations, similar to what is observed during gamma oscillations but without stability of the oscillation frequency with respect to the network external input. Simulations of the full model and theoretical studies of the network's linear response show that the characteristics of the low-noise regime are induced by non-linearities in the model, notably, the saturation of graded inhibition. Finally, we discuss how this model can account for the experimentally observed stability of the oscillatory regimes.

© 2011 Published by Elsevier Ltd.

1. Introduction

The rat olfactory bulb (OB) is a rich and complex sensory-processing system where stimulus-induced activity can be observed, including neural synchronization and oscillations of the Local Field Potential (LFP). These properties are also found in other sensory systems, and they are thought to be important for neural information processing.

In vivo recordings in the mammalian OB have shown LFP oscillations in different frequency bands: a slow rhythm that is tightly linked to the animal's respiratory rhythm (2–10 Hz), and two types of fast oscillations in the beta (15–30 Hz) and gamma (40–90 Hz) bands (for a review, see Gervais et al., 2007, or Kay et al., 2009). Odor presentation to an animal activates the olfactory receptor neurons (ORNs) in the nose, which project to the OB surface to discrete units called glomeruli. ORN axons that converge to the same glomerulus come from neurons with the same olfactory receptor type. Each mitral cell, the principal OB output neurons, receives inputs from a single glomerulus. Due to the segregation of receptor types, different odors activate different spatial maps of glomeruli at the entrance of the OB. However, the presence of numerous inhibitory interneurons in the OB induces a reorganization of this spatial map and generates a mitral cell population output that is modulated both spatially and temporally. The fast LFP oscillations recorded in the bulb are a consequence of this temporal reorganization. Moreover, it has been shown that beta and gamma oscillation occurrence and parameters are modulated by the physical properties of the stimulus (Cenier et al., 2008) and by the state (Freeman and Schneider, 1982) and experience (Ravel et al., 2003) of the animal. These experiments suggest that LFP oscillations may have functional consequences on odor coding and need to be better understood.

* Corresponding author at: INSERM, U1028, Lyon Neuroscience Research Center, Olfactory Coding and Memory Team, Lyon F-69000, France.
E-mail address: nfourcau@olfac.univ-lyon1.fr (N. Fourcaud-Trocmé).

0928-4257/$ - see front matter © 2011 Published by Elsevier Ltd.
doi:10.1016/j.jphysparis.2011.07.009

Indeed, although fast OB oscillations have long been recorded, their mechanisms and functional implication are still highly debated. It is now widely accepted that gamma OB oscillations originate from the interplay between mitral cells and granule cells, the main class of OB inhibitory interneurons (Lagier et al., 2004). Although the origin of beta oscillations is less clear, the fact that the occurrence of beta and gamma oscillations is mutually exclusive suggests that they could have a common generation mechanism. Mitral and granule cells interact via a dendro-dendritic synapse, where both excitation from mitral to granule cells and inhibition from granule to mitral cells occur. Because of their long secondary dendrites, mitral cells can interact with a large population of granule cells over long distances in the OB. The interaction between a given pair of mitral-granule cells is not well known, but the global effect of granule population on a mitral cell has been well studied (Isaacson and Strowbridge, 1998; Urban and Sakmann, 2002). Interestingly, it has been shown that granule cells can inhibit mitral cells without emitting spikes (Lagier et al., 2004; Egger et al., 2005) and that granule cell inhibition is, at least in part, a graded inhibition, which can lead to original oscillatory dynamics (Brea et al., 2009).

In this study, we combined both experimental recordings and computer models to explore the characteristics of fast OB oscillations in anesthetized animals. In particular, by artificially manipulating the animal's respiratory air flow intensity, we looked at the consequences of stimulus intensity changes on OB dynamics. We observed a stability of oscillation parameters, particularly the average frequencies, which led us to hypothesize that oscillation dynamics are primarily determined by OB network parameters. We investigated this hypothesis using a simplified, but biologically realistic, OB model. We explored the oscillatory regimes displayed by the model and investigated to what extent they are independent from stimulus intensity.

2. Material and methods

2.1. Animal preparation and electrophysiology

Experimental methods were the same as described in a previous study (Courtiol et al., 2011) and will therefore only be briefly summarized here. Male Wistar rats (200–450 g) obtained from Janvier (Le Genest-Saint-Isle, France) were anesthetized with urethane (1.5 g/kg, i.p., with additional supplements as needed) and placed in a stereotaxic apparatus. All surgical procedures were conducted in strict accordance with the European Community Council directive of November 24, 1986 (86/609/EEC), as well as the guidelines of the French Ethical Committee and French Legislation, and received approval from the Lyon 1 University Ethics Committee (direction of veterinary service number 69387473).

To mimic variations in the sensory input to the OB, we used a double cannulation protocol, which allows us to uncouple odorant stimulation from the animal's breathing. A tracheotomy was performed by inserting a cannula into the trachea, allowing the rat to breathe freely, while a second cannula was inserted rostrally through the larynx to the postnasal cavity. The latter allowed air to be pushed and pulled through the nasal cavity. We simulated respiratory cycles with a homemade apparatus (described in Courtiol et al., 2011) that allows the reproduction of both the inhalation and exhalation phase. The user was able to choose the simulated airflow parameters (time course and rate). To maintain physiological conditions as much as possible, the simulated airflow was synchronized with the tracheal respiratory signal (recorded simultaneously). We controlled airflow delivery using fast response time airflow sensors (bidirectional micro bridge mass airflow sensor, AWM 2000 series, Honeywell©, see Roux et al., 2006). We delivered odorant stimulation in three different flow rate conditions: low (200 ml/min), basal (500 ml/min) and high (800 ml/min), resulting in a low, medium and high intensity of sensory input, respectively. A 500 ml/min flow rate was selected as the basal flow rate because it reproduced the bulbar LFP signal response to isoamyl acetate (ISO) that is typically recorded under anesthetized non-tracheotomized conditions.

Odors (Sigma Aldrich, Fluka) were delivered in a randomized series through a dilution olfactometer (400 ml/min). The delivered odors were ISO, 2-heptanone (K07), 1-decanol (A10) and p-Cymen (CYM). We chose to stimulate animals with several odors in order to increase the probability of a cell response. All odors were delivered in front of the animal's nose at a fraction of 18% of the saturated vapor pressure for 5 s.

Bulbar activity was recorded as a broadband signal (0.1 Hz to 5 kHz) using 16-channel silicon probes (NeuroNexus Technologies, Ann Arbor, MI) with a homemade 16-channel DC amplifier. Data were digitally sampled at 10 kHz and acquired with a PC using an IOTech acquisition system (Wavebook, IOTech Inc., Cleveland, OH). Probes were placed in the lateral or medial part of the OB close to the mitral cell layer.

2.2. Spike analysis

Signals from individual electrodes were amplified (gain 1000×) and band-pass filtered in the 300–5000 Hz range. Multi-unit activity consisted of a few neurons on each electrode. We chose to use only the well-distinguished units (with a signal-to-noise ratio > 5:1) and to sort cells according to their spike amplitudes. We verified that all sorted cells exhibited a refractory period of at least 4 ms. Consequently, the number of units retained for analysis was restricted to 1 to 3 units per channel. We preferred to use a very strict procedure that resulted in a limited number of units but was also very conservative. This procedure allowed us to be very confident in the quality of the sorting; all units were well isolated, and there were no duplicates.

At each trial, a given cell was considered responsive to odor stimulation if its firing rate increased or decreased or if its pattern within the respiratory cycle changed (see Courtiol et al., 2011) for further details.

2.3. LFP analysis

Wavelet transformed LFPs were obtained by band-pass filtering the recorded signal at 5–200 Hz. We previously developed an algorithm (Roux et al., 2007) to extract phase information from the identified oscillations in the signal. Briefly, for each frequency band of interest, we computed the mean and standard deviation (SD) of the time–frequency map and defined the threshold as the mean + 5 SDs of the time–frequency amplitude contained in the pre-stimulus period (between 0 and 5 s). These thresholds were used to define time and frequency boxes centered on the points of maximum amplitude in the signal. In each box, we extracted a time–frequency ridge line representing all parameters of the given oscillation (phase, frequency, amplitude, starting and ending times) as a function of time. For fast LFP oscillations, the average duration (ending time minus the starting time), frequency (at the maximum value of the oscillatory burst) and amplitude in the OB were compared between flow rate conditions using the Wilcoxon paired test. For all analyses, oscillation characteristics at the basal flow rate were taken as the reference point for comparisons. All data storage and analyses were performed using OpenElectrophy software (Garcia and Fourcaud-Trocme, 2009).

2.4. Olfactory bulb model

Our OB model was inspired by Brea et al. (2009). It consists of $N_E = 100$ mitral cells and a single granule cell with a graded

inhibition. It describes a single OB glomerulus with its associated mitral and granule cells rather than a full OB network. The use of a single granule cell came from anatomical considerations (Egger and Urban, 2006) and viral tracings (Willhite et al., 2006), which suggest that mitral cells connected to the same glomerulus may be linked to a local subset of the granule cell population with a high level of connectivity. Due to the high degree of connectivity, the local granule population can be reduced to a single granule cell.

Mitral cells were modeled according to Bathellier et al. (2006).[1] Essentially, this is a single compartment model using the standard Hodgkin–Huxley formalism. It includes fast sodium (I_{Na}) and fast delayed rectifier potassium (I_{Kf}) currents, a slow inactivating *K* current (*A*-current, I_{KA}), a slow *K* current (I_{Ks}) and a persistent *Na* current (I_{Nap}). The interaction between I_{Ks} and I_{Nap} creates a subthreshold resonance similar to what has been observed experimentally. Note that compared to Bathellier et al. we increased the I_{Ks} activation time constant to $\tau_{m,Ks} = 18$ ms. We used this parameter to decrease the frequency of the mitral cell subthreshold resonance, bringing it closer to the beta frequency range. However, we found that this resonance did not qualitatively affect our simulation results.

The granule cell is similar to a model previously used by Brea et al. (2009). It includes passive dendritic and somatic compartments:

$$C_m \frac{dV_S}{dt} = -g_L(V_S - E_L) + g_{SD}(V_D - V_S) \quad (1)$$

$$C_m \frac{dV_D}{dt} = -g_L(V_D - E_L) + g_{DS}(V_S - V_D) \quad (2)$$

where V_S and V_D are the somatic and dendritic membrane potentials, $C_m = 0.01$ F m^{-2}, $g_L = 0.83$ S m^{-2} and $E_L = -70$ mV. To model the effect of the different sizes of the somatic and dendritic compartments, we used different coupling variables: $g_{SD} = 1$ S m^{-2} and $g_{DS} = 300$ S m^{-2}.

The dendrodendritic coupling between mitral and granule cells is modeled by an excitatory coupling from mitral cells to the dendritic granule cell compartment and an inhibitory coupling in the other direction. This induces both lateral and recurrent inhibition of mitral cells, as observed *in vitro* (Urban and Sakmann, 2002). Synaptic currents are given by

$$I_{syn} = g_{syn} s (V_{post} - V_{syn}) \quad (3)$$

where V_{pre} and V_{post} are the pre- and postsynaptic membrane potentials, respectively, and s is a synaptic gating variable. Its dynamics are governed by:

$$\frac{ds}{dt} = \alpha(1 - s)T - \beta s \quad (4)$$

$$T = \frac{1}{1 + \exp\left(-\frac{V_{pre} - V_{act}}{\sigma}\right)} \quad (5)$$

Excitatory synapse parameters are $\alpha_E = 10$ ms^{-1}, $\beta_E = 1/3$ ms^{-1}, v$V_{act,E} = 0$ mV, $\sigma_E = 0.01$ mV and $V_E = 0$ mV. Depending on simulations, we used either $g_E = 3.5$ S m^{-2} (high g_E) or $g_E = 0.7$ S m^{-2} (low g_E). Inhibitory synapses parameters are $\alpha_I = 5$ ms^{-1}, $\beta_I = 1/10$ ms^{-1}, $V_{act,I} = -66.4$ mV, $\sigma_I = 0.4$ mV and $V_I = -70$ mV. Unless otherwise stated, we used $g_I = 10$ S m^{-2}. The different values of V_{act} and σ induce a qualitative difference between excitation and inhibition. Excitatory synapses need an input spike in order to open, and they remain open only briefly. In contrast, inhibitory synapses are graded and slowly open as the granule dendritic potential V_D increases; no spike is needed to transmit inhibition. This difference models the experimentally observed graded inhibition, which is partly due to the fact that each mitral cell is connected to a large population of granule cells (Kapoor and Urban, 2006) and to the fact that granule cells can inhibit mitral cells without spiking.

The network receives an excitatory input, modeled by a noisy conductance (g_{Ein}) injected into mitral cells (no external input is provided to granule cells), given by:

$$\tau_{Ein} \frac{dg_{Ein}}{dt} = g_{Ein,0} - g_{Ein} + \sigma_{Ein}\eta(t) \quad (6)$$

where $\tau_{Ein} = 3$ ms and $\eta(t)$ is an independent white noise for each mitral cell. We used either $\sigma_{Ein} = 0.002$ S m^{-2} s$^{\frac{1}{2}}$ (low noise) or $\sigma_{Ein} = 0.02$ S m^{-2} s$^{\frac{1}{2}}$ (high noise), and $g_{Ein,0}$ was chosen from within the range of 0.02–2.5 S m^{-2}. Note that during simulations, g_{Ein} signal was rectified to allow only non-negative values. Negative values of g_{Ein} were replaced by 0. This had an effect only in the high noise (high σ_{Ein}) and low average input (low $g_{Ein,0}$) simulations.

Note that the similar input to all mitral cells is consistent with a model that is closer to the description of a single glomerulus with all mitral cells receiving input from the same olfactory receptor neurons. It cannot reproduce the dynamics of a full OB model, which should include differential spatial activation of mitral cells as well as some spatial organization of the connectivity between mitral and granule cells.

The network frequency f was determined as the frequency of the maximum of the power spectral density of $\langle s_E \rangle$, i.e., s_E averaged across mitral cells. Basically, $\langle s_E \rangle$ is a filtered version of the mitral cell population discharge. Both f and the mitral cell average firing rate, ν_0, were computed during a 1 s simulation period after an equilibrium simulation time of 1 s.

Simulations were performed on a multicore standard x86 Linux workstation using the Python neuron simulator, BRIAN (Goodman and Brette, 2008).

2.5. Model linear response

We computed the network linear response using a mean field approach (Geisler et al., 2005). Briefly, we assumed that the firing of mitral cells is a Poisson process, with a time-dependent rate $\nu(t)$. This firing rate depends on the network input, $g_{Ein,0}$ and σ_{Ein}, and on the feedback loop. When the network enters an oscillatory regime, if we assume that the oscillation amplitude is small and that all oscillatory network variables stay in a linear regime, we can compute the network frequency and gain. Practically, we write $\nu(t) = \nu_0 + \nu_1 \cos(2i\pi ft)$ where f is the network frequency, ν_0 is the average mitral firing rate and ν_1 is the amplitude of the rate modulation. The linear response is then obtained by assuming $\nu_1 \ll \nu_0$ and expanding all model equations at first order in ν_1. The detailed calculations are given in the appendix.

Analytical calculation of the linear response can be performed only for the granule cell portion of the model; the linear response of mitral cells, ν_1 as a function of $s_{I,1}$ (modulation of the inhibitory feedback) cannot be derived analytically due the complexity of the mitral cell model. To compute the response for the whole network, we computed the linear response of mitral cells numerically (e.g., see Fourcaud-Trocmé and Brunel (2005)).

Once the linear responses of all network variables are known, a self-consistent equation linking the phase and the amplitude, $\nu(t)$, of the oscillation can be obtained, which yields a prediction of the network's frequency and gain.

3. Results

3.1. Stability of fast oscillations in vivo

In anesthetized rats, odor stimulations induced fast oscillations of the OB LFP. In our typical experiments, gamma bursts occurred

[1] ModelDB (http://senselab.med.yale.edu/ModelDb/default.asp) accession number: 91387.

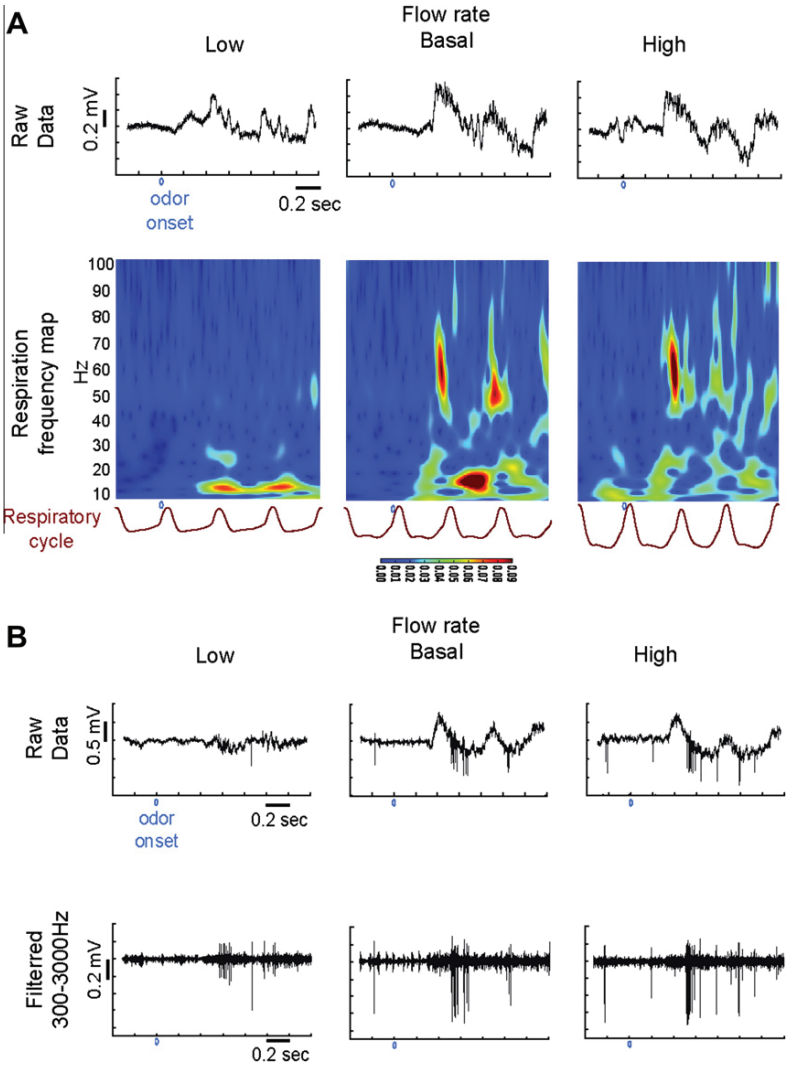


Fig. 1. Examples of experimental recordings. (A) For the same electrode, raw LFP traces (upper panels) and corresponding time frequency plots (lower panels) in lower, basal and high input flow rate conditions (from left to right). We observed stable beta and gamma frequency ranges in all conditions but a change in oscillation occurrence (fewer gamma oscillations and more beta oscillations at lower input flow rates). (B) For a second electrode, raw LFP traces (upper panels) and high-pass filtered LFP traces (>300 Hz, lower panels). We observed an increase in multi-unit activity for higher input flow rates.

at the end of inhalation, when stimulus activation was maximal, and beta bursts occurred during the exhalation phase, when stimulus activation vanished (see Fig. 1). Gamma and beta bursts never overlapped and were not present on each odor presentation. Indeed, we have previously shown (Cenier et al., 2009) that in the anesthetized rat, gamma and beta burst occurrence is random and that their probability to occur during odor presentation primarily depends on the odor's physical properties. For this reason, we used different odor stimuli (see the Material and Methods section) to maximize the number of recorded oscillatory bursts in each frequency band.

In parallel to odor presentation, we manipulated the stimulus intensity by changing the nasal flow rate (see details in the Material and Methods section). We observed that the number of gamma oscillatory bursts significantly increased when the flow rate was increased (low vs. basal, $p < 0.01$; basal vs. high, $p < 0.001$, Wilcoxon test), whereas the number of beta oscillatory bursts significantly decreased (low vs. basal, $p < 0.001$; basal vs. high, $p < 0.001$, Wilcoxon test). However, the intrinsic characteristics of the oscillations, such as duration, amplitude and frequency, were not modified, except for the duration and amplitude of gamma episodes, which significantly decreased when flow rate was decreased. Data are presented in Table 1. As observed previously *in vivo* (Buonviso et al., 2003) or *in vitro* (Lagier et al., 2004), gamma oscillatory episodes commonly displayed a slight decay of their instantaneous frequency. This can be seen in the examples of Fig. 1. Such decay was generally not observed during beta oscillations. We quantified the average frequency decay during a single oscillation in Table 1.

Therefore, the intrinsic characteristics of LFP oscillations are very stable. In particular, gamma and beta frequencies do not change with sensory input intensity.

In contrast, such stability was not observed in the activity of individual mitral cells. Indeed, we observed that a low flow rate induced a significantly lower percentage of responsive mitral cells (low: 66.7% vs. basal: 88.9%; χ^2 test, $p < 0.05$). No significant difference was observed between basal and high flow rate conditions (basal: 88.9% vs. high 91.7% $p > 0.05$). Moreover, when comparing the mean instantaneous firing frequency under the three flow rate conditions, we observed that, whereas it reached 61.58 Hz and

Table 1
Means (±SEM) of LFP intrinsic characteristics. Duration (seconds), amplitude (arbitrary units), frequency (hertz) and frequency decay (hertz) are shown for beta and gamma oscillations and for the three flow rate conditions. Data from low and high flow rate conditions were compared to data from the basal flow rate condition ($n = 23$ trials); the gray shadow indicates statistical significance (statistical test: Wilcoxon, $*p < 0.05$).

Characteristics	Flow rate	Beta	Gamma
		Mean (±SEM)	Mean (±SEM)
Duration (s)	Low	0.242 (±0.016)	0.101 (±0.008)
	Basal	0.209 (±0.014)	0.135 (±0.011)
	High	0.215 (±0.163)	0.132 (±0.011)
Amplitude (Arbitrary unit)	Low	9.137 (±0.804)	9.544 (±0.677)
	Basal	9.446 (±0.846)	12.479 (±1.802)
	High	8.548 (±1.113)	9.871 (±1.134)
Frequency (Hz)	Low	15.900 (±0.462)	52.821(±1.035)
	Basal	16.949 (±0.576)	53.749(±1.273)
	High	14.912 (±0.560)	54.656 (±1.108)
Frequency decay (Hz)	Low	0.008 (±0.170)	1.268(±0.424)
	Basal	0.012 (±0.174)	1.027(±0.343)
	High	0.042 (±0.246)	0.899 (±0.349)

51.26 Hz under the basal and high flow rate conditions, respectively, it was significantly decreased under the low flow rate condition (42.89 Hz).

3.2. Fast oscillations in an olfactory bulb model

Because we experimentally observed that fast oscillations are stable for a wide range of stimuli, we hypothesized that fast oscillation dynamics are largely determined by intrinsic network parameters. Following this hypothesis, external network inputs would have an effect on the specific oscillatory regime the network settles into, but they would not influence its dynamics.

To test this hypothesis, we designed a simplified, but biologically realistic, OB network model (see Section 2). We tested how it generated beta and gamma oscillations and what their sensitivities to external network input strengths were. Extensive simulations conducted with our model led us to distinguish a low-noise and a high-noise regime (depending on σ_{Ein}, the amplitude of input noise to mitral cells). These regimes are described in the following sections.

3.2.1. Low-noise regime: stability of beta band oscillations

Fig. 2 shows two simulations of the network in the low- noise regime, $\sigma_{Ein} = 0.002\ \mathrm{S\ m^{-2}\ s^{\frac{1}{2}}}$. In the upper panels, the mean excitatory input is relatively small ($g_{Ein,0} = 0.5\ \mathrm{S\ m^{-2}}$), which yields an average firing rate of $\nu_0 = 4.6$ Hz and a network oscillation frequency of $f = 33$ Hz. In the lower panels, we increased the excitatory input to $g_{Ein,0} = 0.9\ \mathrm{S\ m^{-2}}$. This resulted in a firing rate of $\nu_0 = 13.3$ Hz and a network oscillation frequency of $f = 28.1$ Hz. Interestingly, whereas the doubling of the excitatory drive to the network caused a similar doubling of the mitral cell average firing rate, the network frequency remained more or less stable.

A closer look at the simulation allowed us to explain this phenomenon. In Fig. 2A, the raster plot shows that only a small number of mitral cells discharge on each cycle, but this is sufficient to saturate the graded inhibitory synapse coefficient (red traces in the left panels) and, therefore, is sufficient to prevent other cells from discharging. At low σ_{Ein}, the fluctuations of mitral cell potentials are small. Consequently, their subthreshold states are strongly correlated, and when the graded inhibition decreases in each cycle, all mitral cells reach their firing threshold almost simultaneously. Small, independent fluctuations are the only reason why some cells spike earlier and then prevent the other cells from firing. The example in the left panel of Fig. 2A clearly shows that, on each network oscillation, the cell is close to its emission threshold; whether or not a spike actually occurs depends only on instantaneous random fluctuations of the input.

The global picture is therefore a random subset of mitral cells firing on each cycle, which saturates the graded inhibition and results in a random discharge of individual cells. When $g_{Ein,0}$ increases, as in Fig. 2B, more cells fire on each cycle because they reach their threshold faster, whereas inhibition takes time to build up on each cycle. However, the strength of feedback inhibition is capped by the graded inhibition maximum, g_I, and its decay time depends only on granule cell intrinsic and synaptic parameters.

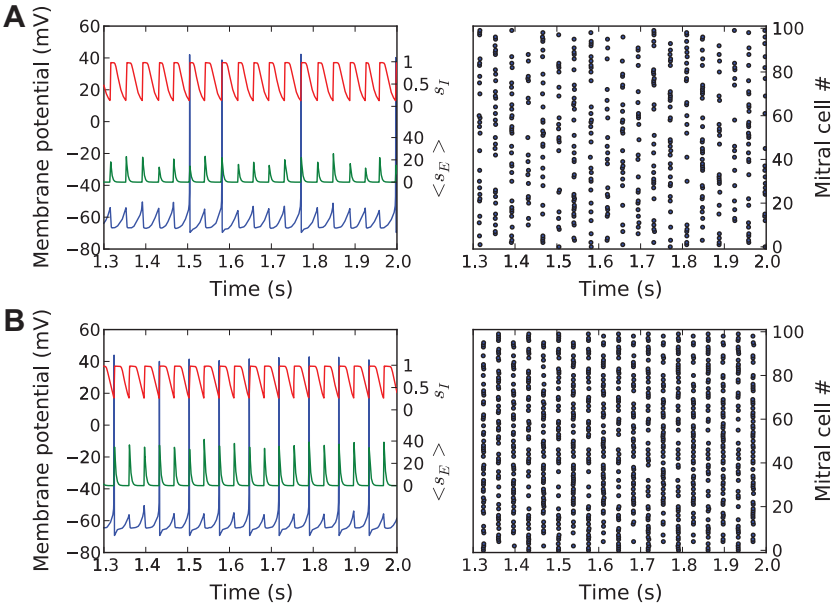


Fig. 2. Network oscillations in the low-noise regime ($\sigma_{Ein} = 0.002\ \mathrm{S\ m^{-2}\ s^{\frac{1}{2}}}$) with $g_{Ein,0} = 0.5\ \mathrm{S\ m^{-2}}$ (top, A) and $g_{Ein,0} = 0.9\ \mathrm{S\ m^{-2}}$ (bottom, B). High g_E:$g_E = 3.5\ \mathrm{S\ m^{-2}}$ Left: traces of a typical mitral cell membrane potential (blue line), activation of the graded inhibition (s_I, red line) and the average activation of excitation from mitral to granule $\langle s_E \rangle$. Note that the latter is used to determine the network frequency. Right: raster plot of 100 mitral cells.

Therefore, the decay of graded inhibition depends only weakly on the number of mitral cells that discharged on the last cycle. Cycle length is therefore only slightly sensitive to ν_0.

In fact, two concurrent effects may affect the network frequency. First, a higher $g_{Ein,0}$ allows mitral cells to discharge faster when graded inhibition is higher. Second, a higher ν_0 increases the excitatory drive to the granule dendrite and therefore maintains the graded inhibitory synapse in its saturated state for a longer period. The first effect tends to increases the oscillation frequency of the network, whereas the second one tends to decrease it. Overall, we observe that the network frequency remains stable.

To investigate which parameters are important for frequency stability, we varied several network parameters (Fig. 3). We first explored a wide range of input conductances $g_{Ein,0}$ from 0.02 S m^{-2} to 2.42 S m^{-2} (Fig. 3A). In the right panel, we observe a plateau where f is approximately constant while ν_0 increases [3–13] Hz. This plateau corresponds to the [0.25–1] S m^{-2} range of $g_{Ein,0}$ shown in the left panel. In that range, the firing rate increases approximately linearly with $g_{Ein,0}$. The mechanisms underlying this plateau are the same as described previously in the description of Fig. 2. The plateau in the right panel is followed by a region where we have $f = 2\nu_0$. This interval corresponds to $g_{Ein,0}$ in the [1 − 1.7] S m^{-2} range. We can see on the left panel that both f and ν_0 increase in this range, but at different speeds. Indeed, we have observed that 50% of the mitral cells discharged on each cycle in this range (data not shown). This led to the formation of two clusters of cells discharging alternately. The example in Fig. 2B is close to this behavior. Due to the noise added to the mitral cells input, the two clusters were not stable, and several cells jumped from one cluster to the other in each cycle. In this regime, the increase of $g_{Ein,0}$ drives the increase of f, whereas the longer saturation of the graded inhibition is no longer sufficient to compensate for it. Finally, at very high $g_{Ein,0}$ we get a single cluster where every cell discharges at each cycle ($f = \nu_0$), as can be seen for $\nu_0 > 30$ Hz in the right panel of Fig. 3A. Note that the transition from the 2-cluster to 1-cluster regime is very fast when looking at ν_0 as a function of $g_{Ein,0}$ (left panel); therefore, the apparent plateau we have in the $f - \nu_0$ plateau (right panel) for ν_0 in 20–30 Hz range is not relevant because any small change in $g_{Ein,0}$ drives the system out of this plateau.

We next investigated the effect of the parameters on the feedback loop. First, we decreased the granule cell excitatory input g_E (Fig. 3B, red markers). In the left panel, we observe that the oscillatory plateau around $f = 25$ Hz is smaller. Similarly, in the right panel, the plateau in the $f - \nu_0$ plane almost disappeared and corresponds to a much shorter range of $g_{Ein,0}$. However, we can see that the $f = 2\nu_0$ regime lasts longer, which means that at low g_E, we primarily have a two-cluster regime. This can be simply explained by the fact that at low g_E a larger number of mitral spikes are necessary to saturate the graded inhibition and to prevent other mitral cells from spiking. Therefore, even for low $g_{Ein,0}$, half of the mitral cells have to spike on each cycle to saturate the inhibition, which leads to the two-cluster regime. Interestingly, this regime appears stable for a wide range of $g_{Ein,0}$, but further simulations (not shown) showed that it is very sensitive to small increases in the noise of the network excitatory drive σ_{Ein}.

We then looked at the effect of changing the graded inhibition, g_I (Fig. 3C). As with the change of g_E, changes to g_I do not have a significant effect on the plateau aspect of the $f - \nu_0$ plane (Fig. 3C, right panel). In particular, the network frequency f is only slightly affected by the strength of inhibition. This result is in line with the conclusion of Bathellier et al. (2008), who made an analytical study of similar network dynamics using a standard inhibition, not a graded one. However, in our case, when looking at f as a function of $g_{Ein,0}$ (Fig. 3C, left panel), we observe that the extent of the plateau is larger for higher levels of inhibition. Overall, we conclude that high levels of synaptic conductances in the feedback inhibitory loop (both g_E and g_I) are necessary to increase the $g_{Ein,0}$ range of stability of the network oscillation f.

Finally, we previously mentioned that the existence of the plateau is due to the saturation of graded inhibition. Therefore, its frequency, f, must be driven by the duration of the inhibition saturation and the time inhibition takes to increase and decay. To check this, we modified the time constant of the graded inhibition by multiplying α_I and β_I by a factor of $x = 0.5$ or $x = 2$ (Fig. 3D). The plateau range in the left panel was not affected by the time constant changes; however, we clearly see in the $f - \nu_0$ plane (right panel) that the plateau average frequency increases for shorter time constants (higher α_I and β_I). This confirms that the plateau frequency is controlled by the time constant of the feedback inhibition loop.

3.2.2. High noise regime: gamma band oscillations

At a high level of excitatory input noise, σ_{Ein}, the network dynamics change dramatically. Two examples with $\sigma_{Ein} = 0.02$ S m^{-2} s$^{\frac{1}{2}}$ are shown in Fig. 4A and B (high and low g_E, respectively). In the first case, we have $\nu_0 = 6.1$ Hz and $f = 63.5$ Hz and, in the second, $\nu_0 = 13.5$ Hz and $f = 59.2$ Hz. Compared to the low-noise regime, f is larger for similar $g_{Ein,0}$ and ν_0. However, the raster plots (Fig. 4, right panels) show that discharge is much less synchronized in each oscillation cycle.

This result can be interpreted as an effect of decorrelation. Because of the high level of input noise, mitral cell discharge is more random and less controlled at the level of each individual cell by the strength of inhibition. However, fluctuations of the graded inhibition still affect the discharge at the population level by modulating the population average discharge probability. This type of network oscillation, with individual stochastic discharges, has already been described in various types of recurrent networks (Brunel and Wang, 2003; Geisler et al., 2005), and similar dynamics have been used to describe *in vitro* gamma oscillations in an OB model (Bathellier et al., 2006). Compared to the low-noise regime, where mitral cell subthreshold potentials were strongly correlated, a high noise level spreads mitral membrane potentials over a wide range of potential. In particular, there are always a small fraction of mitral cells close to their spiking threshold. This allows the mitral cell population to react quickly to any small change in its average inhibitory input and sustains faster oscillations than in the low noise regime with a similar average firing rate.

To explore this regime in more depth, we plotted the network frequency f as a function of $g_{Ein,0}$ and ν_0 with low and high g_E in Fig. 5. The main observation is that, contrary to the low-noise regime, there is no plateau with a stability of f. Here, the network frequency is highly dependent on the average level of excitatory input, $g_{Ein,0}$, over the entire tested range. Note that higher $g_{Ein,0}$ have not been plotted because they correspond to a fully saturated graded inhibition, which results in no network oscillation. Interestingly, lower g_E allows the network to reach a higher network frequency. This is due to the fact that at lower g_E, the graded inhibition fluctuations are smaller and less prone to reaching saturation, which would limit the transmission of fast fluctuations.

3.2.3. Modeled linear response can predict oscillation frequencies only in the high-noise regime

In previous studies of recurrent networks with individual stochastic discharge (Brunel and Wang, 2003; Geisler et al., 2005), it was shown that it is possible to predict the network frequency from the linear response of network components. The calculation is based on the hypothesis that the average mitral cell firing rate can be described by

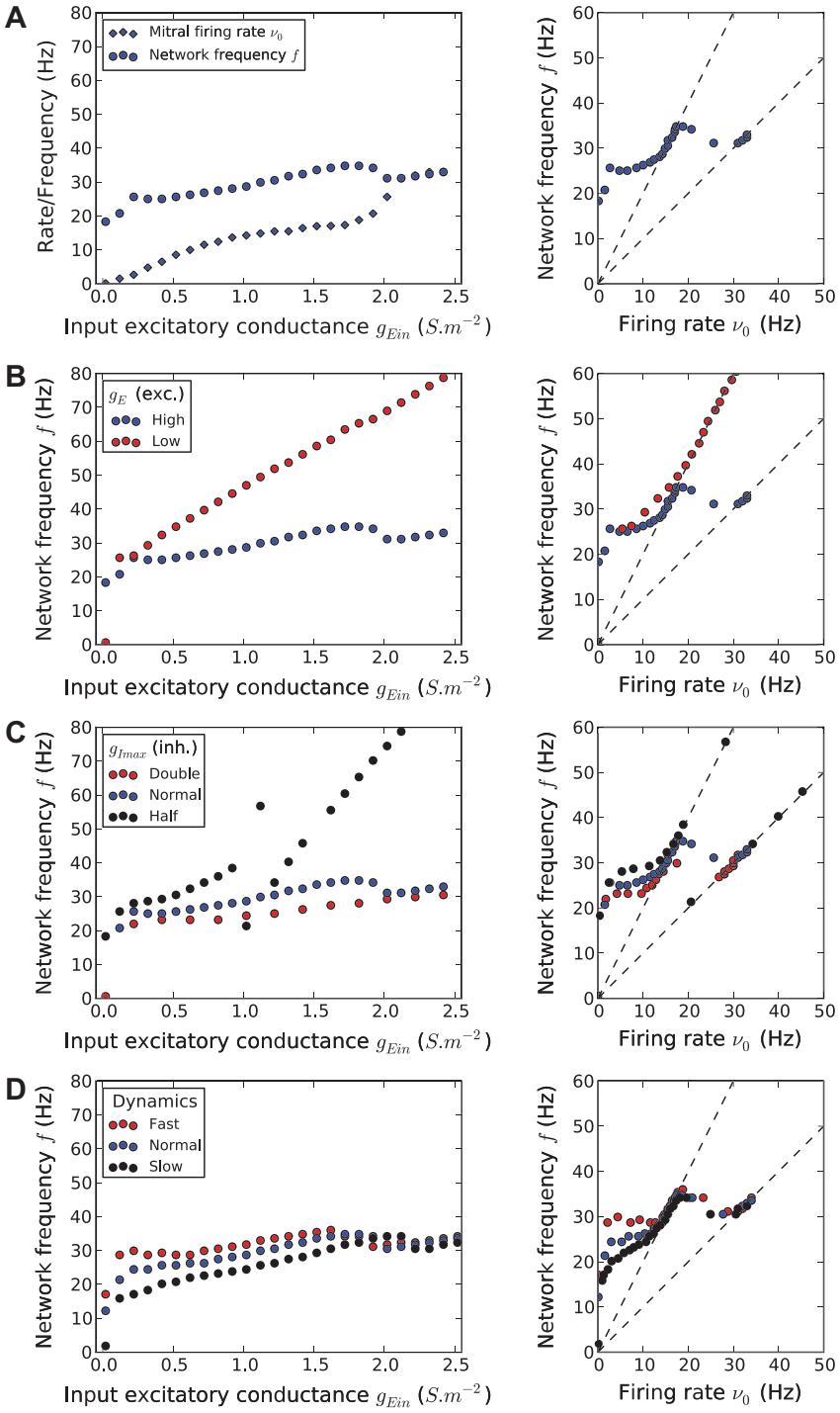


Fig. 3. Effect of network parameters on oscillation frequency and the average mitral firing rate in the low-noise regime. $\sigma_{Ein} = 0.002$ S m^{-2} s_2^{-1}. **A:** Left: oscillation frequency, f, and mitral rate, ν_0 vs. $g_{Ein,0}$. Right: the same data but with f as a function of ν_0. Note that in the range of ν_0 3–13 Hz, f is essentially constant. **B–D**: The same control data as in **A** and additional data. Left panels: f vs. $g_{Ein,0}$, right panels: f vs. ν_0. Modifying the loop synaptic strength (g_E in **B** and g_I in **C**) does not affect the plateau with a stable f vs. ν_0 in the right panels. However, it does change the speed at which this plateau is scrolled when $g_{Ein,0}$ increases (points are always spaced by the same increase of $g_{Ein,0}$). In the last row (**D**), we multiplied the graded inhibition time constant by a factor $x = 0.5$, 1 or 2 Additional data: low $g_E = 0.7$ S m^{-2} (**B**), double inhibition $g_I = 20$ S m^{-2} and half inhibition $g_I = 5$ S m^{-2} (**C**).

$$v(t) = \nu_0 + \nu_1 \cos(2\pi f t)$$

with $\nu_1 \ll \nu_0$.

We can compute the propagation of this oscillation (both amplitude and phase) in the feedback inhibitory loop analytically (granule cell excitation, s_E; granule dendritic compartment potential, V_D; graded inhibition activation, s_I). We can simulate the mitral cell model to obtain its linear response to inhibitory input oscillations. The inhibitory oscillation depends on $g_{Ein,0}$, σ_{Ein} and $g_{I,0}$. In particular, $g_{I,0}$ must be first computed by determining the

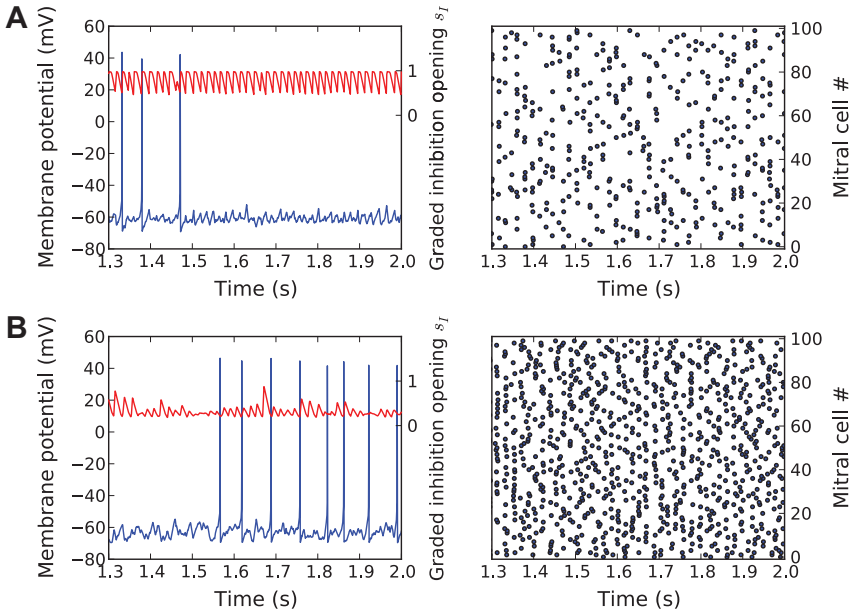


Fig. 4. Network oscillations in the high noise regime: $\sigma_{Ein} = 0.02$ S m^{-2} s_2^1, $g_{Ein,0} = 1.2$ S m^{-2} with high $g_E = 3.5$ S m^{-2} (top, **A**) and low $g_E = 0.7$ S m^{-2} (bottom, **B**). Left: traces of a typical mitral cell membrane potential (blue line) and activation the graded inhibition (red line). Right: raster plot of 100 mitral cells.

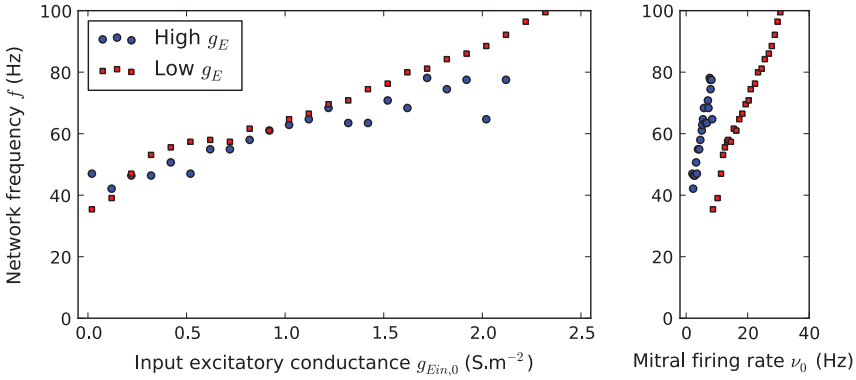


Fig. 5. Network frequency in the high-noise regime: $\sigma_{Ein} = 0.02$ S m^{-2} s_2^1 with high $g_E = 3.5$ S m^{-2} or) and low $g_E = 0.7$ S m^{-2}. Note that, contrary to the low-noise case (Fig. 3), we observe no stability of f as a function of either $g_{Ein,0}$ (left panel) or ν_0 (right panel).

stationary state of the loop (see the Material and Methods section and the Appendix for additional details). Once all linear responses are known, we can write a self-consistent equation for $\nu(t)$ that states that $\nu(t)$ must be the same at the entrance and exit of the loop. The phase and amplitude solutions of this equation yield the network frequency and gain.

We used this method to predict the network oscillation frequency and the average mitral firing rate when the network is in the low- or high-noise regime (see Fig. 6). In the low-noise regime (Fig. 6A), we observe that neither ν_0 nor f can be predicted by the linear response calculation unless $g_{Ein,0}$ is very low. In fact, these low values correspond to a high-noise case, as $g_{Ein,0}$ is quite small compared to σ_{Ein}, which is constant across all simulations. However, for higher $g_{Ein,0}$, the theory cannot predict the existence and extent of a plateau. This confirms that the plateau is due to the non-linear dynamics present in the model and, in particular, to the saturation of the graded inhibition. In contrast, in the high-noise regime (Fig. 6B), the theory predicts both f and ν_0 very well for a wide range of $g_{Ein,0}$. Note that the discrepancies at low $g_{Ein,0}$ correspond to parameter values for which the linear response predicts a loop gain below 1 (and thus no oscillatory instability) and where the simulation only shows small and irregular oscillations (data not shown).

4. Discussion

This study focused on the stability of OB fast rhythms in the beta and gamma frequency bands. We first experimentally showed that altering the intensity of odor stimulation resulted in an increase of the mitral cell firing rate but left the fast LFP oscillations largely unchanged. In particular, the LFP average frequencies were not affected by changes of the stimulation intensity. This suggests that the frequency of LFP oscillations depends on intrinsic properties of the mitral-granule network.

In the second part of our study, we explored the stability of fast rhythms in a biologically plausible model of the OB network that includes realistic mitral cell dynamics (Bathellier et al., 2006) and

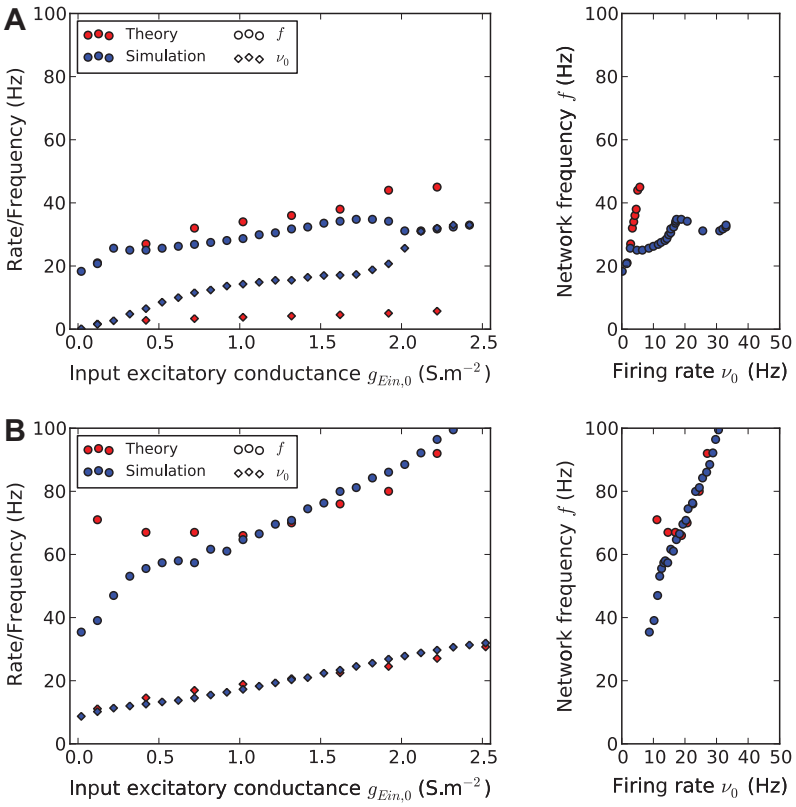


Fig. 6. Comparison of simulation and modeled linear response: **A**: left panel: network frequency and mitral cell firing rates as a function of $g_{Ein,0}$ obtained with either a network simulation (blue symbols) or theoretical determination of the network linear response (red symbols). Right panel: the same data in the f vs. ν_0 plane. The model is in the low noise regime, and the parameters are the same as in Fig. 2. Note that the simulation and theory agree only at very low $g_{Ein,0}$, where the average input becomes small compared to the noise input. **B**: same as in A, but in the high-noise regime; the parameters are the same as in Fig. 4B. The agreement between theory and simulation is good except at low $g_{Ein,0}$, where the noise is high compared to the average input level. In this range, the linear response predicts a network oscillatory gain below 1 and, indeed, the simulations display only small and irregular oscillations.

a single granule cell with graded inhibition (Brea et al., 2009). Detailed simulations and theoretical analysis of our model showed that two dynamical regimes could be distinguished.

First, for low amounts of input noise, our model displayed an oscillatory regime whose frequency, around 25–30 Hz, i.e., in the beta band, was stable for a wide range of average levels of input excitation. This stability is due to the saturation of the graded inhibition by a small subset of the mitral cell population. Therefore, it is favored by a strong mitral-granule synaptic coupling, and the value of the stable frequency is partly controlled by the time constants of synaptic inhibition (Fig. 3). In this case, firing cells are well synchronized, and the population is silent between spike volleys.

Second, for high amounts of input noise, the individual discharge was much more random, which lead to a less synchronized discharge on each oscillation cycle. This regime allows for higher network oscillation frequencies, more than 40 Hz with our parameters and relatively low average firing rates. This is very similar to what has already been described for *in vitro* gamma oscillations by a previous OB model (Bathellier et al., 2006), and we suggest it is also well-suited to describe gamma oscillations *in vivo*.

However, in the high-noise regime, the network frequency is highly dependent on the level of average excitatory input (Fig. 5). This observation appears to be inconsistent with our experimental observation of stable gamma frequency for different stimulus intensities. Nonetheless, the direct effect of changing the stimulus intensity on mitral cell excitatory input *in vivo* is unknown. Indeed, stimulus input is actually relayed from olfactory receptor neurons (ORN) to mitral cells through glomerular units, which are groups of many ORN axon terminals and mitral primary dendritic tufts. Intraglomerular synaptic activity is complex, and Gire and Schoppa (2009) recently suggested that glomerular activation could be all or nothing. In this case, changes of stimulus intensity would modify the number of activated glomeruli but not the output intensity of the active ones. An increase in the number of activated glomeruli would then explain the increased mitral firing rate and responsiveness that we obtained experimentally. However, excitatory input of mitral cells should only depend on the state of their glomerulus, active or not, and should therefore be determined by intraglomerular dynamics and should not be directly proportional to the stimulus intensity. This stability of the excitatory input could explain the stable frequency of the gamma oscillations generated locally between the mitral cells of a given glomerulus and their associated granule cells.

Interestingly, such a scenario has been proposed in the moth (Ito et al., 2009) to explain the stability of fast oscillations in the antennal lobe (the analog of the OB in the insect) when the animal is stimulated with different odor concentrations. In addition, during odor stimulation, Ito et al. observed a frequency decay of the fast oscillation independent of the odor concentration that they attributed to an adaptation of the output of olfactory receptor neurons. Such an adaptation at the glomerular level could also explain the small frequency decay that we observed experimentally during gamma oscillations and is compatible with a gamma mechanisms whose frequency is mainly determined by the excitatory input level.

Under that hypothesis, stable gamma frequencies would result from the stability of active glomeruli output. At low levels of activation (non-activated glomeruli), we would observe beta

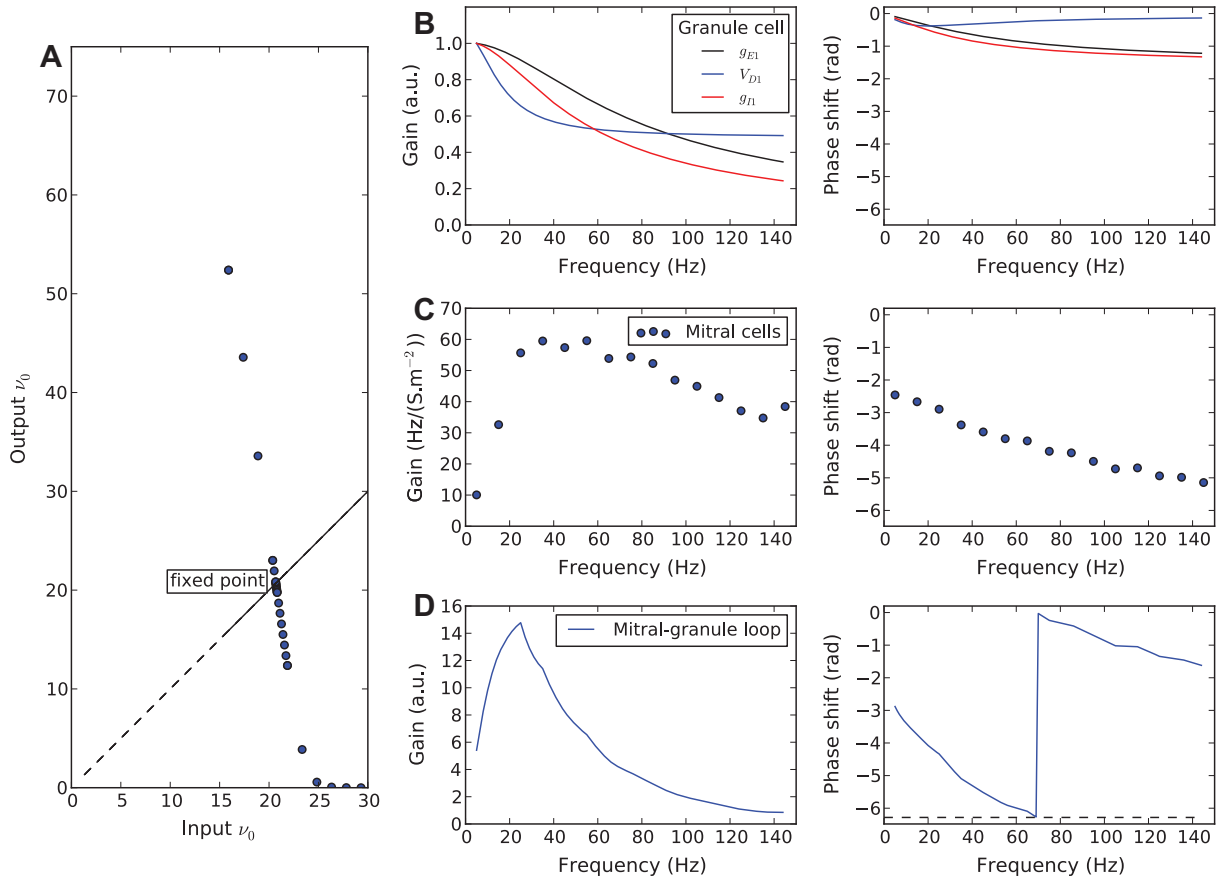


Fig. A.7. Theoretical determination of network frequency and gain using the linear response: **A**: Self-consistent determination of ν_0, see Eq. (A.9). Input ν_0 is used to successively compute $g_{E,0}$, $V_{D,0}$ and $s_{I,0}$. Finally, $s_{I,0}$ is used to simulate the mitral cell model and get the "output ν_0". The loop fixed point is obtained when the input and output ν_0 are equal. As we had to simulate the mitral cell model to get its output ν_0, we used a dichotomous method to obtain the fixed point, which explains the irregular point positions in the graph. **B**: Analytically computed linear response of network variables (left: gain, normalized to 1 at 5 Hz, right: phase shift), see Eqs. (A.4), (A.6) and (A.8). **C**: The simulated linear response of the mitral cell model. **D**: The full mitral-granule loop linear response obtained by multiplying the normalized complex linear response of each element of the loop. The loop gain is the product of all gains; loop phase shift is the sum of all phase shifts. The network frequency is obtained when the loop phase shift is -2π, which means there is exactly one cycle difference between the input oscillation of $\nu(t)$ and the output oscillation after its propagation in the granule loop. A gain below 1 means that the oscillation is not stable and should vanish.

oscillations whose frequency is already stabilized by network intrinsic dynamics for a wide range of excitatory input.

The next question is what controls the oscillatory regime of the OB network. First, we showed that, given a set of parameters defining the mitral-granule loop, an increase of the input noise can make the network frequency switch from beta to gamma. If we assume that the noise level is partially proportional to the level of excitatory input, as it is the case with Poisson processes, for example, then our model is compatible with recordings in anesthetized rats (Buonviso et al., 2003), which display gamma oscillations when odor input is maximal, at the transition between inspiration and expiration, and beta oscillation when it is minimal, at the end of expiration.

Second, in our model, beta oscillation stability requires the saturation of the graded inhibition and therefore requires strong mitral to granule excitatory connections (g_E). In contrast, a small g_E prevents the model from entering the non-linear regime and therefore favors gamma oscillations. Interestingly, Balu et al. (2007) have shown that the mitral-granule excitatory synapse displays a strong short-term depression. This suggests that low mitral cell firing rates could favor high g_E and beta oscillations. Conversely, high mitral cell firing rates would favor a low g_E and result in gamma oscillations. This is in agreement with the experimental observation that mitral cells phase-locked to gamma oscillations have higher firing rates than mitral cells phase-locked to beta oscillations (Cenier et al., 2009).

Third, it has been experimentally shown that odor learning favors the appearance of beta oscillations in response to known odors (Ravel et al., 2003). In our model, odor learning could correspond to an increase in the strength of the mitral-granule loop excitatory and inhibitory conductances (as in the model described by Migliore et al., 2010, for example) and therefore favor the beta regime in response to known odors, as observed experimentally.

In Fig. 1, we showed the alternation of gamma and beta oscillations during a single respiratory cycle of an anesthetized rat. It would be interesting to reproduce this result with our model. However, as we stated previously, gamma oscillation frequency is not intrinsically stable, and indeed, varying the model parameters (e.g., $g_{Ein,0}$, σ_{Ein} or g_E) can continuously shift the frequency from a beta to gamma regime. The clear jump from gamma to beta that we observed experimentally could be achieved in our model with fast changes of model parameters, but we do not know of any experimental evidence that supports this scenario. In addition, we recently showed experimentally (Cenier et al., 2009) that mitral cells phase-locked to beta and gamma oscillations form two distinct subsets of cells, likely associated with distinct glomeruli,

depending on the glomerulus activation level. As our model describes a single glomerulus, it cannot account for such a scenario. Therefore, it would be worth studying a full OB model that includes an ensemble of small local networks (one for each glomerulus) and is able to generate beta or gamma oscillations independently, as in our study. These local networks could then interact via the long mitral cell lateral dendrites and potentially generate model-wide oscillations.

In our model, beta and gamma oscillations are both generated intrinsically in the OB. However, it is known that in the absence of cortical feedback, beta oscillations are abolished (Neville and Haberly, 2003) or at least strongly reduced (Martin et al., 2004). This absence of cortical feedback could be modeled by a strong hyperpolarization of granule cells. In this case, the saturation of the graded inhibition would not be possible, and beta oscillations would be hindered.

In conclusion, this is the first study to propose a mechanism modeling beta oscillations and use it to show how they can be stabilized. With regard to gamma oscillations, our results are close to a previous study (Bathellier et al., 2006), but different from others such as Brea et al. (2009), which relies on a strong mitral cell resonance in the gamma range, or Marella and Ermentrout (2010), which uses amplification of stochastic synchronization. However, in these studies, gamma oscillation frequency is generally not stable as a function of excitatory input, and an additional mechanism is still needed, as we previously discussed.

Appendix A. Computation of the linear response network

We assume that mitral cell discharge is random, with an average firing rate given by

$$\nu(t) = \nu_0 + \nu_1 e^{2i\pi ft} \tag{A.1}$$

We used complex notations to facilitate the analytical calculations, but the final results are obtained by taking the real part of all complex equations. In the following, for any model variable x, x_0 refers to its stationary part and x_1 to its oscillatory part. Note that x_1 can be complex because it describes both the amplitude and phase shift of x's linear response (see Fig. A.7).

First, mitral cells excite granule cells via the excitatory synapses described by (4). Here, the variable T can be considered an instantaneous pulse, and the synaptic equation is reduced to

$$\frac{ds_E}{dt} = -\beta_E s_E + \sum_{t_i<t} \delta(t - t_i) \tag{A.2}$$

where t_i is the ith presynaptic spike time and δ the Dirac function. With our approximation of random mitral cell discharge, we have $\sum_{t_i<t}\delta(t-t_i) = N_E\nu(t)\tau_E$, where $\beta_E = 1/\tau_E$, and using (A.1), we obtain

$$s_{E,0} = N_E \nu_0 \tau_E \tag{A.3}$$

$$s_{E,1} = \frac{N_E \nu_1 \tau_E}{1 + 2i\pi f \tau_E} \tag{A.4}$$

This excitatory input is then transmitted to the granule cell dendritic compartment described by (1). Using the same method and keeping only first-order terms, we have, for the dendritic compartment,

$$V_{D,0} = \frac{s_{E,0} g_E (g_{SD} + g_L) V_E + G g_L E_L}{s_{E,0} g_E (g_{SD} + g_L) + G g_L} \tag{A.5}$$

$$V_{D,1} = \frac{-s_{E,1} g_E (V_{D,0} - V_E)(G + 2i\pi f C_m - g_{DS})}{(2i\pi f C_m + g_L)(G + 2i\pi f C_m) + s_{E,0} g_E (G + 2i\pi f C_m - g_{DS})} \tag{A.6}$$

where $G = g_L + g_{DS} + g_{SD}$.

Finally, graded inhibition depends directly on $V_D(t)$ through (5); thus, we get

$$[c]s_{I,0} = \frac{\alpha_0}{\beta_I + \alpha_0} \tag{A.7}$$

$$s_{I,1} = \frac{\alpha_0 (1 - s_{I,0})(1 - \frac{\alpha_0}{\alpha_I}) \frac{V_{D,1}}{\sigma_I}}{\beta_I + \alpha_0 + 2i\pi f} \tag{A.8}$$

where

$$\alpha_0 = \frac{\alpha_I}{1 + e^{-\frac{V_{D,0} - V_{act,I}}{\sigma_I}}}$$

To compute the stationary response of the network, we have

$$\nu_0 = F(g_{Eln,0}, \sigma_{Ein}, s_{I,0}) \tag{A.9}$$

$$= F(g_{Eln,0}, \sigma_{Ein}, s_{I,0}(V_{D,0}(s_{E,0}(\nu_0)))) \tag{A.10}$$

where F is the firing rate function of mitral cells, which has to be computed numerically. The last equation gives a self-consistent condition for ν_0 and allows us to determine the stationary variables. Once the stationary state of the network is known, we can compute the first-order oscillatory component with

$$\nu_1 = H(g_{Eln,0}, \sigma_{Ein}, s_{I,0}, s_{I,1}) \tag{A.11}$$

$$= H(g_{Eln,0}, \sigma_{Ein}, s_{I,0}, s_{I,1}(V_{D,1}(s_{E,1}(\nu_1)))) \tag{A.12}$$

where H is the mitral cell linear response computed numerically by looking at the mitral cell rate modulation to small s_I oscillatory modulation.

References

Balu, R., Pressler, R.T., Strowbridge, B.W., 2007. Multiple modes of synaptic excitation of olfactory bulb granule cells. J. Neurosci. 27, 5621–5632.

Bathellier, B., Carleton, A., Gerstner, W., 2008. Gamma oscillations in a nonlinear regime: a minimal model approach using heterogeneous integrate-and-fire networks. Neural Comput. 20, 2973–3002.

Bathellier, B., Lagier, S., Faure, P., Lledo, P.M., 2006. Circuit properties generating gamma oscillations in a network model of the olfactory bulb. J. Neurophysiol. 95, 2678–2691.

Brea, J.N., Kay, L.M., Kopell, N.J., 2009. Biophysical model for gamma rhythms in the olfactory bulb via subthreshold oscillations. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 106, 21954–21959.

Brunel, N., Wang, X.J., 2003. What determines the frequency of fast network oscillations with irregular neural discharges? I. Synaptic dynamics and excitation–inhibition balance. J. Neurophysiol. 90, 415–430.

Buonviso, N., Amat, C., Litaudon, P., Roux, S., Royet, J.P., Farget, V., Sicard, G., 2003. Rhythm sequence through the olfactory bulb layers during the time window of a respiratory cycle. Eur. J. Neurosci. 17, 1811–1819.

Cenier, T., Amat, C., Litaudon, P., Garcia, S., Lafaye de Micheaux, P., Liquet, B., Roux, S., Buonviso, N., 2008. Odor vapor pressure and quality modulate local field potential oscillatory patterns in the olfactory bulb of the anesthetized rat. Eur. J. Neurosci. 27, 1432–1440.

Cenier, T., David, F., Litaudon, P., Garcia, S., Amat, C., Buonviso, N., 2009. Respiration-gated formation of gamma and beta neural assemblies in the mammalian olfactory bulb. Eur. J. Neurosci. 29, 921–930.

Courtiol, E., Amat, C., Thevenet, M., Messaoudi, B., Garcia, S., Buonviso, N., 2011. Reshaping of bulbar odor response by nasal flow rate in the rat. PLoS ONE 6, e16445.

Egger, V., Svoboda, K., Mainen, Z.F., 2005. Dendrodendritic synaptic signals in olfactory bulb granule cells: local spine boost and global low-threshold spike. J. Neurosci. 25, 3521–3530.

Egger, V., Urban, N.N., 2006. Dynamic connectivity in the mitral cell-granule cell microcircuit. Semin. Cell Dev. Biol. 17, 424–432.

Fourcaud-Trocmé, N., Brunel, N., 2005. Dynamics of the instantaneous firing rate in response to changes in input statistics. J. Comput. Neurosci. 18, 311–321.

Freeman, W.J., Schneider, W., 1982. Changes in spatial patterns of rabbit olfactory EEG with conditioning to odors. Psychophysiology 19, 44–56.

Garcia, S., Fourcaud-Trocme, N., 2009. OpenElectrophy: an electrophysiological data- and analysis-sharing framework. Front Neuroinformatics 3, 14.

Geisler, C., Brunel, N., Wang, X.J., 2005. Contributions of intrinsic membrane dynamics to fast network oscillations with irregular neuronal discharges. J. Neurophysiol. 94, 4344–4361.

Gervais, R., Buonviso, N., Martin, C., Ravel, N., 2007. What do electrophysiological studies tell us about processing at the olfactory bulb level? J. Physiol. Paris 101, 40–45.

Gire, D.H., Schoppa, N.E., 2009. Control of on/off glomerular signaling by a local GABAergic microcircuit in the olfactory bulb. J. Neurosci. 29, 13454–13464.

Goodman, D., Brette, R., 2008. Brian: a simulator for spiking neural networks in python. Front Neuroinformatics 2, 5.

Isaacson, J.S., Strowbridge, B.W., 1998. Olfactory reciprocal synapses: dendritic signaling in the CNS. Neuron 20, 749–761.
Ito, I., Bazhenov, M., Ong, R.C., Raman, B., Stopfer, M., 2009. Frequency transitions in odor-evoked neural oscillations. Neuron 64, 692–706.
Kapoor, V., Urban, N.N., 2006. Glomerulus-specific, long-latency activity in the olfactory bulb granule cell network. J. Neurosci. 26, 11709–11719.
Kay, L.M., Beshel, J., Brea, J., Martin, C., Rojas-Libano, D., Kopell, N., 2009. Olfactory oscillations: the what, how and what for. Trends Neurosci. 32, 207–214.
Lagier, S., Carleton, A., Lledo, P.M., 2004. Interplay between local GABAergic interneurons and relay neurons generates gamma oscillations in the rat olfactory bulb. J. Neurosci. 24, 4382–4392.
Marella, S., Ermentrout, B., 2010. Amplification of asynchronous inhibition-mediated synchronization by feedback in recurrent networks. PLoS Comput. Biol. 6, e1000679.
Martin, C., Gervais, R., Chabaud, P., Messaoudi, B., Ravel, N., 2004. Learning-induced modulation of oscillatory activities in the mammalian olfactory system: the role of the centrifugal fibres. J. Physiol. Paris 98, 467–478.
Migliore, M., Hines, M.L., McTavish, T.S., Shepherd, G.M., 2010. Functional roles of distributed synaptic clusters in the mitral-granule cell network of the olfactory bulb. Front Integr. Neurosci. 4, 122.
Neville, K.R., Haberly, L.B., 2003. Beta and gamma oscillations in the olfactory system of the urethane-anesthetized rat. J. Neurophysiol. 90, 3921–3930.
Ravel, N., Chabaud, P., Martin, C., Gaveau, V., Hugues, E., Tallon-Baudry, C., Bertrand, O., Gervais, R., 2003. Olfactory learning modifies the expression of odour-induced oscillatory responses in the gamma (60–90 Hz) and beta (15–40 Hz) bands in the rat olfactory bulb. Eur. J. Neurosci. 17, 350–358.
Roux, S.G., Cenier, T., Garcia, S., Litaudon, P., Buonviso, N., 2007. A wavelet-based method for local phase extraction from a multi-frequency oscillatory signal. J. Neurosci. Methods 160, 135–143.
Roux, S.G., Garcia, S., Bertrand, B., Cenier, T., Vigouroux, M., Buonviso, N., Litaudon, P., 2006. Respiratory cycle as time basis: an improved method for averaging olfactory neural events. J. Neurosci. Methods 152, 173–178.
Urban, N.N., Sakmann, B., 2002. Reciprocal intraglomerular excitation and intra- and interglomerular lateral inhibition between mouse olfactory bulb mitral cells. J. Physiol. (Lond.) 542, 355–367.
Willhite, D.C., Nguyen, K.T., Masurkar, A.V., Greer, C.A., Shepherd, G.M., Chen, W.R., 2006. Viral tracing identifies distributed columnar organization in the olfactory bulb. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 103, 12592–12597.

OPEN ACCESS Freely available online

PLoS one

Faster, Deeper, Better: The Impact of Sniffing Modulation on Bulbar Olfactory Processing

Frédéric Esclassan, Emmanuelle Courtiol, Marc Thévenet, Samuel Garcia, Nathalie Buonviso, Philippe Litaudon*

Centre de Recherche en Neurosciences de Lyon (CRNL) Equipe Olfaction : du codage à la mémoire, CNRS UMR 5292 - INSERM U1028 - Université Lyon 1 – Université de Lyon, Lyon, France

Abstract

A key feature of mammalian olfactory perception is that sensory input is intimately related to respiration. Different authors have considered respiratory dynamics not only as a simple vector for odor molecules but also as an integral part of olfactory perception. Thus, rats adapt their sniffing strategy, both in frequency and flow rate, when performing odor-related tasks. The question of how frequency and flow rate jointly impact the spatio-temporal representation of odor in the olfactory bulb (OB) has not yet been answered. In the present paper, we addressed this question using a simulated nasal airflow protocol on anesthetized rats combined with voltage-sensitive dye imaging (VSDi) of odor-evoked OB glomerular maps. Glomerular responses displayed a tonic component during odor stimulation with a superimposed phasic component phase-locked to the sampling pattern. We showed that a high sniffing frequency (10 Hz) retained the ability to shape OB activity and that the tonic and phasic components of the VSDi responses were dependent on flow rate and inspiration volume, respectively. Both sniffing parameters jointly affected OB responses to odor such that the reduced activity level induced by a frequency increase was compensated by an increased flow rate.

Citation: Esclassan F, Courtiol E, Thévenet M, Garcia S, Buonviso N, et al. (2012) Faster, Deeper, Better: The Impact of Sniffing Modulation on Bulbar Olfactory Processing. PLoS ONE 7(7): e40927. doi:10.1371/journal.pone.0040927

Editor: Michel Renou, INRA-UPMC, France

Received January 30, 2012; **Accepted** June 15, 2012; **Published** July 17, 2012

Copyright: © 2012 Esclassan et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This work was supported by a grant from the French National Research Agency (grant number ANR-07-NEURO-030). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: litaudon@olfac.univ-lyon1.fr

Introduction

The understanding of sensory information processing is a major challenge for neuroscience, as this processing is the foundation that generates representations of the world in both humans and animals. Numerous works have already clearly established several common features concerning the processing of various sensory modalities. One of the most important features is the cerebral topographic coding of stimuli. This topographic coding consists in the apparition of orderly cortical representations or maps that reflect the stimulation of a specific sensory receptor subgroup [1].

In contrast to the tactile somatotopic, visual retinotopic, and auditory tonotopic maps, the existence of such a topographic coding for olfactory stimuli has been strongly debated [2–5]. Although visual, tactile, and auditory stimuli can be easily described and discriminated using a small number of continuous variables, the complexity of olfactory molecules has prevented the establishment of classifications based on a limited set of characteristics. However, an increasing number of studies have highlighted the presence of an olfactory chemotopic coding system in the insect antennal lobe and mammalian olfactory bulb (OB) [6–8]. A single odorant activates only a small and specific subgroup of olfactory sensory neurons that converge onto a limited number of glomeruli in the OB [9]. Hence, in the OB, the identity of odorants is associated with a unique spatial map.

In addition to this spatial coding, olfactory information processing is also based upon dynamic mechanisms that depend on the physical method by which stimuli are led to their sensory receptors. In mammals, the respiration cycle itself provides the mechanism for odor stimuli sampling. Even among the very first electrophysiological studies [10], the powerful influence of breathing was observed in the OB and olfactory cortex. Thus, respiratory modulation of both local field potential (LFP) signals and unitary activities has been extensively described in the OB and piriform cortex [11–17].

In addition to its role as the vector for odor molecules, respiratory dynamics have been considered as an integral part of the olfactory percept in both animals and humans by various authors [18–20]. It has been shown that rats adapt their sniffing strategy, both in frequency and flow rate, when performing odor discrimination and detection tasks [21]. Therefore, the question of how these sampling variations affect olfactory system activity is of growing interest.

In the past few years, several studies have addressed this question at the OB input terminal level [22–25], and most of these studies have focused on the impact of sampling frequency on input dynamics. Although Oka et al. [23] also studied the impact of sniffing flow rate, the effects of different sniffing components were analyzed individually, and they failed to analyze the response dynamics. At the OB output level (i.e., mitral cell activity and local field potential recordings), different studies have noted the importance of sniffing frequency [13,26] and sniffing flow rate [13,27].

In the present paper, we studied how the two primary components of sniffing behavior, i.e., frequency and flow rate, jointly contribute to the spatio-temporal representation of odors at the OB level. To achieve this goal, we used voltage-sensitive dye imaging (VSDi) combined with an artificial sniffing paradigm in anesthetized rats. Artificial sniffing allowed the independent control of flow rate and frequency within the physiological range [13]. Contrary to most previous optical imaging studies addressing this question at the OB input terminal level, the responses measured with voltage-sensitive dye arise primarily from sources downstream of the olfactory nerve input [28]. This allows possible reshaping of the input activity by local interneurons at the post-synaptic level to be taken into account. This study, to our knowledge, is the first to give an insight of how both sniffing frequency and flow rate modulate both the amplitude and the dynamics of odor evoked VSDi response. Thus, the present study makes the link between data obtained at the OB input [22–25] and output [13,26,27] level respectively. To strengthen our conclusions, OB LFPs were also recorded in this experiment.

Results

Validation of Artificial Sniffing Paradigm

One concern for using artificial sniffing was the reliability of the sampling parameters. Contrary to most previously used devices [23,24], our artificial sniffing simulator reproduces both respiratory phases, inspiration and expiration, while reaching high-frequency sniffing (10 Hz) [27] (Fig. S1). Therefore, we first needed to ensure that changes in the response dynamics and/or observed amplitudes at different frequencies were not due to side-effects related to an unstable flow rate between low and high artificial sniffing frequencies. Although it was not possible to measure the absolute flow rate at the entrance of the nostril with our respiratory monitoring setup [29] (see Figure S2 legend), we demonstrated that the actual relative flow rate through the nostril varied linearly with the imposed flow rate whatever the sniffing frequency while matching the imposed frequency (Fig. S1). The second step was to demonstrate that this artificial sniffing protocol combined with VSDi allowed us to record reliable optical responses in the OB. Our goal, herein, was not to analyze the specificity or the reproducibility of odor evoked maps as it has been largely demonstrated in the literature [8,30–32]. We used a 2 Hz artificial breathing frequency that corresponded with the respiratory frequency in anesthetized rats. As previously reported [28], odors evoked specific patterns of post-synaptic activity in the dorsal OB (Fig. 1A), these patterns being similar when using same odor in a given rat. We then analyzed the time-course of the optical responses, focusing on responding glomeruli. As shown in figure 1B, odor presentation evoked a fast increase in fluorescence of approximately 0.6% compared with the basal fluorescence value, which reflected OB activation. As previously reported [28], this response exhibited two components: a tonic component lasting for the duration of odor stimulation and a superimposed phasic component phase-locked with the sampling pattern. Conversely, the non-activated regions did not present a tonic response but were still able to develop a smaller phasic component during odor presentation. Time-frequency maps computed from these responses (Fig. 1C) confirmed that optical signal modulation clearly corresponded with the 2 Hz imposed sniffing frequency.

The following analyses focused on the optical response time-course parameters. As no statistical differences were observed between the odors, data from all odors were pooled for the following analyses. Thus a total of 536 recordings obtained from 20 rats were included in statistical analysis.

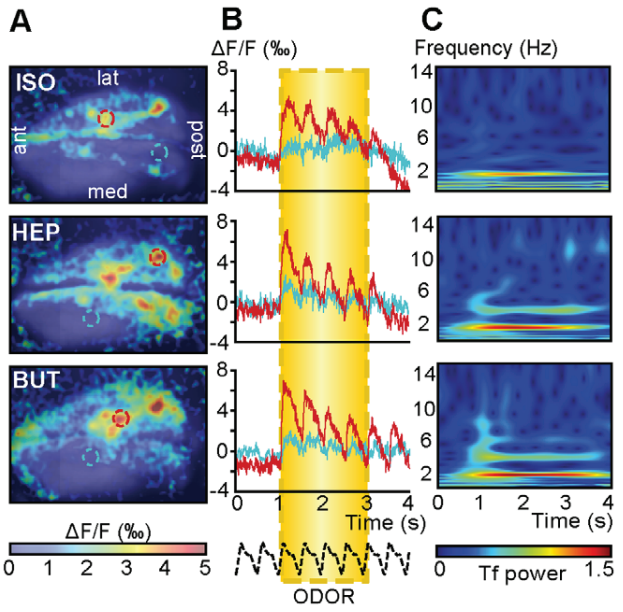


Figure 1. Odor-evoked maps at a resting sniffing frequency. A: VSDi maps evoked by three different odors. Red and blue circles indicate the regions of interest used to compute the optical signal time-course. B: Optical signal time-courses computed from the activated area (red) and non- (low)-activated area (blue). The bottom black dashed line represents the imposed sniffing signal. Yellow box indicates odor stimulation period. C: A time-frequency representation computed from the red signals displayed in B. Time-frequency power (Tf power, arbitrary unit) is color-coded (the color scale is the same for both time-frequency maps).
doi:10.1371/journal.pone.0040927.g001

Sniffing Frequency Strongly Impacts the Phasic Component of VSDi Responses

Previous studies using Ca^{2+} imaging of receptor cell terminals in the OB showed that the phasic response component decreased with increased sniffing frequency and even disappeared at a frequency of around 6 Hz [22,24,25]. Here, we used several sniffing frequencies (up to 10 Hz) within the physiological range. In the raw glomerular responses, a phasic component could be observed at frequencies up to 4 Hz. This sampling-related modulation decreased with increasing frequencies but was still observable at 6 Hz, as shown in the time-frequency representation (Fig. 2A). The phasic component of the glomerular optical response disappeared at the highest imposed sniffing frequency (10 Hz). Even if individual examples of raw VSDi data demonstrated an impact of sniffing on signal dynamics, one could raise the question of reproducibility in such observations. Because the respiratory dynamics were imposed by the sniffing simulator, the experimental protocol timing was highly reproducible across recordings for a given frequency. Using this reproducibility, we averaged the VSDi responses from all of the responses evoked by a given sniffing frequency, regardless of the flow rate and odor used. As shown in figure 2B, sampling-related modulation was clearly distinguishable from the mean signal with a sampling frequency up to 6 Hz, which demonstrates that the modulation observed in one rat (Fig. 2A) was a general feature of the VSDi glomerular responses. It should also be noted that high-frequency sniffing (see 4 Hz or 6 Hz in figure 2B) led to a stepwise rising phase before reaching the maximum level. To confirm these results, we generated a mean time-frequency representation: time-frequencies representations were computed from all individual responses and

then averaged across the responses for each frequency. Except for 10 Hz, the mean time-frequency representations exhibited an increased power during odor presentation in the frequency band corresponding with the imposed sniffing frequency (Fig. 2B). This result was used to quantify the sniffing modulation and demonstrate that the power increase observed in the time-frequency representation was not only a frequency component or harmonic of the tonic response. We extracted the maximum power of the time-frequency representation in each frequency band of interest and compared it with the frequency content of continuous simulation (0 Hz), which only evoked a tonic component in the response, using a one-way ANOVA. The power increase in the optical responses corresponding with the imposed sniffing frequency was significantly higher than the corresponding frequency content of the tonic component for 1 Hz ($F_{(1,122)} = 78.2$, $P<0.0001$), 2 Hz ($F_{(1,208)} = 143.3$, $P<0.0001$), 4 Hz ($F_{(1,180)} = 97.2$, $P<0.0001$), and 6 Hz ($F_{(1,132)} = 35$, $P<0.0001$) but not 10 Hz ($F_{(1,120)} = 1.47$, $P = 0.23$) (Fig. S3A).

We also wanted to verify that the lack of a phasic component at 10 Hz was not related to a limitation of our artificial sniffing set-up. First, a 10-Hz modulation was observed for some optical responses (Fig. S4), even if such modulation was not statistically present when averaging responses. Second, we applied the same experimental paradigm for the LFP recordings. As shown in figure 3, LFPs also developed a phasic response locked to the imposed sampling. As observed in the VSDi responses, the LFP sniffing modulation amplitude decreased with increasing frequency even if the decrease was weak compared with the optical response. Interestingly, LFP signals remained clearly modulated by sniffing at the highest imposed frequency (10 Hz). This result was confirmed by a quantitative analysis based on time-frequency representation (Fig. S3B). These data also confirmed that although a 10 Hz modulation was not always present in the optical response, the OB network was still able to exhibit sniffing modulation.

Lastly, we wanted to identify how sniffing modulation could impact the spatial distribution of odor-evoked activity. The data shown in figure 4 shows that sniffing frequency had little effect on the activation map computed from the tonic response. Indeed, the spatial distribution of early-responding glomeruli remained similar, independent of the imposed sniffing frequency. We also performed the first spatial distribution analysis of the phasic VSDi response component by developing a pixel-by-pixel time-frequency analysis. We observed that the phasic component power map largely overlapped with the tonic component map (Fig. 4), which indicated that sniffing modulation was spatially concomitant with the odor-evoked response. Nevertheless, there was an obvious decreasing in the spread of the phasic component when the sampling frequency was increased.

Effect of Frequency on the Tonic and Phasic Components of the VSDi Signal Amplitude Depends on Flow Rate

When exploring their environment, rats varied both their sniffing frequency and flow rate [21]. After having demonstrated that OB activity could be maintained at high-frequency sniffing, we investigated how the sniffing flow rate impacted OB activity concomitantly with sniffing frequency.

Tonic response. The mean VSDi signals computed as a function of sniffing frequency regardless of flow rate indicated that sniffing frequency had little impact on the amplitude of the VSDi tonic component responses (Fig. 2B). To evaluate the extent to which the flow rate impacted VSDi responses concomitantly with frequency, we performed a quantitative analysis of the VSDi tonic component amplitude. All descriptive statistics are detailed in supplementary Table S1. As shown in figure 5A, flow rate had little impact on optical responses in low-frequency sniffing (2 Hz). Conversely, the flow rate appeared to impact the response amplitude at high sniffing frequencies. A two-way ANOVA on signal amplitude with flow rate and sniffing frequency as factors confirmed significant effects of both flow rate ($F_{(2,\ 518)} = 19.8$, $P<0.0001$) and frequency ($F_{(5,\ 518)} = 8.95$, $P<0.0001$) and a significant interaction between these two factors ($F_{(10,\ 518)}, = 2.756$, $P<0.01$). Partial ANOVAs for each flow rate confirmed that sniffing frequency had no significant effect on signal amplitude at a high flow rate (1000 ml/min, $F_{(5,\ 242)} = 1.16$, $P>0.1$; see figure 2A). Conversely, for moderate (500 ml/min) and low (250 ml/min) flow rates, there was a statistically significant effect of increased sniffing frequency on the tonic component amplitude ($F_{(5,\ 205)} = 4.62$, $P<0.001$ and $F_{(5,\ 71)} = 11.7$, $P<0.0001$, respectively). Post-hoc analyses of these data confirmed a decrease in tonic component amplitude only for the highest sniffing frequency (10 Hz) when using a moderate flow rate and an earlier frequency increase effect when using a low flow rate (Fig. 5B).

Phasic response. We next investigated the impact of both sampling parameters on the phasic sampling-related component of the optical responses (Fig. 5C). Both sampling frequency ($F_{(4,\ 462)} = 93.714$, $P<0.0001$) and flow rate ($F_{(2,\ 462)} = 8.642$, $P<0.001$) had a significant impact on the phasic component amplitude of the response (see all descriptive statistics in supplementary Table S2). The phasic component amplitude decreased with increasing frequency and decreasing flow rate. We did not observe a significant interaction between flow rate and frequency. In contrast to its effect on the tonic response, flow rate only partially counterbalanced the frequency effects.

Discussion

Sniffing behavior is one of the key features of mammal olfactory perception, as sensory input is intimately related to respiration. Behavioral studies have already highlighted the importance of sniffing modulation in both flow rate and frequency during odor discrimination and detection tasks [21] or after novel odor presentation [33,34]. The present work was the first attempt to analyze the concomitant effects of both frequency and flow rate on odor-evoked glomerular maps using VSDi. Using our newly developed artificial sniffing simulator, which allowed us to reproduce rat sniffing behavior at frequencies of up to 10 Hz, our data demonstrated that sniffing frequency and flow rate jointly impact the level and the dynamic of glomerular responses. These results bridged the gap between previous data obtained by Oka et al. [23] at the OB input level, and data from Courtiol et al. [13,27] at the OB output level. Indeed, if Oka et al. [23] showed main impact of sniffing flow rate on the response amplitude, they only analyzed effects of sniffing frequency and flow rate separately. Moreover, the low temporal resolution of their recording method did not allow them to analyze the dynamics of sniffing related modulation of optical responses. Combined with the first time-frequency analysis of optical signals, VSDi showed that high sniffing frequency retained the ability to modulate OB activity at the glomerular level.

Respiration Related Modulation can be Maintained in High-frequency Sniffing

Contrary to previous studies showing that sniffing modulations of odor-evoked glomerular optical responses tend to disappear at frequencies around 5–6 Hz [22,24,25], our results showed that odor-evoked OB activity remained modulated in high-frequency sniffing both at the glomerular and intrinsic network levels. This

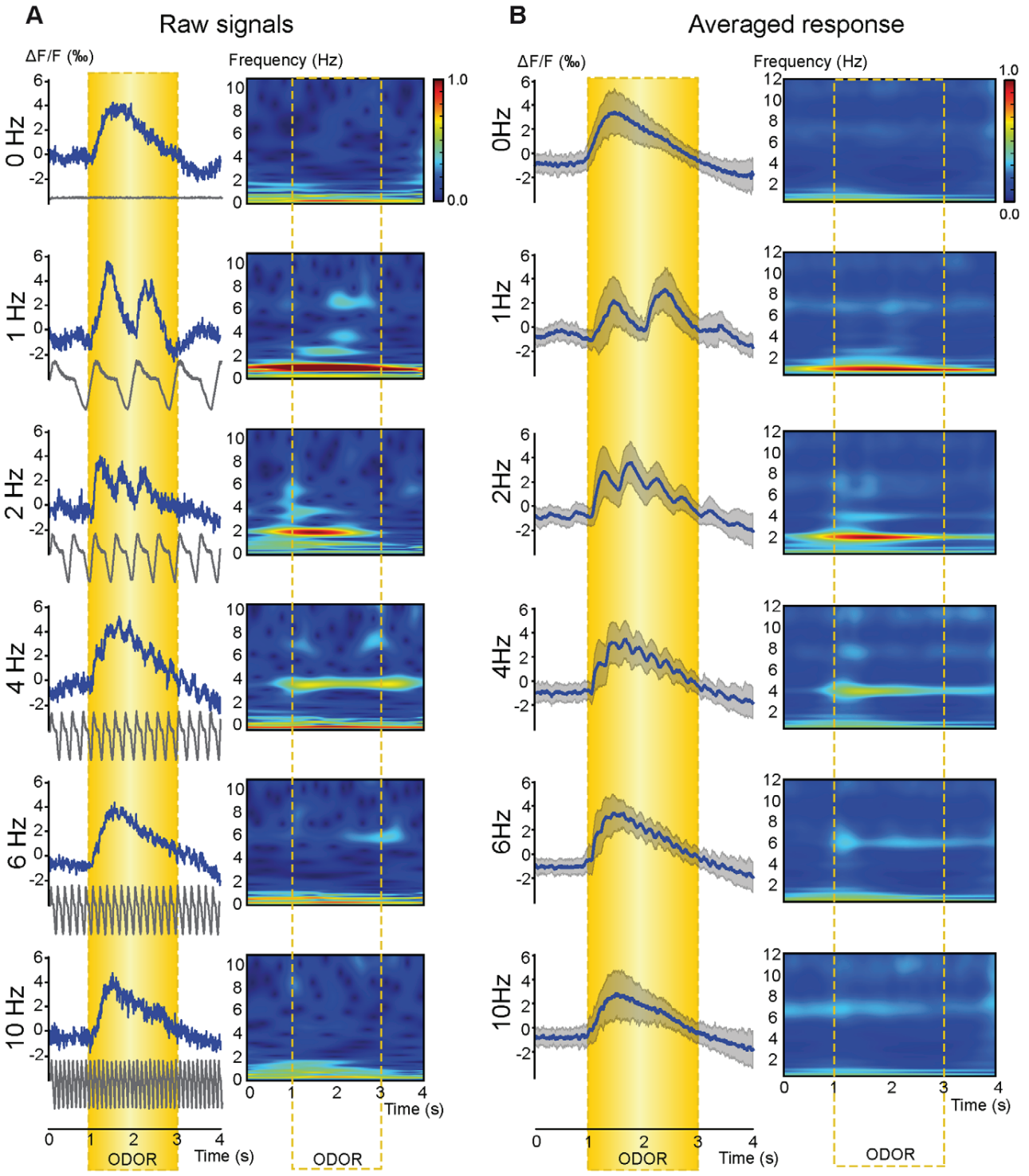


Figure 2. Impact of sniffing frequency on VSDi signal dynamics. A: An example of a raw VSDi signal time-course (left) computed from the activated areas (see Fig. 1 and material and methods) and corresponding time-frequency representations (right). The black traces at the bottom of each panel represent the imposed sniffing signal recorded at the nostril entrance. Each line corresponds with a different sniffing frequency. Responses were recorded using a 1000 ml/min flow rate. The color scale (arbitrary unit) was the same for all time-frequency representations. B: Averaged optical responses (blue line) ± SD (shadow area) computed from all animals according to the different sniffing frequencies (left), regardless of flow rate (0 Hz, n = 59; 1 Hz, n = 65; 2 Hz, n = 151; 4 Hz, n = 123; 6 Hz, n = 75; 10 Hz, n = 63). The corresponding mean time-frequency representation (right) computed from all individual time-frequency representations. The color scale (arbitrary unit) was the same for all time-frequency representations. Yellow box indicates odor stimulation period.
doi:10.1371/journal.pone.0040927.g002

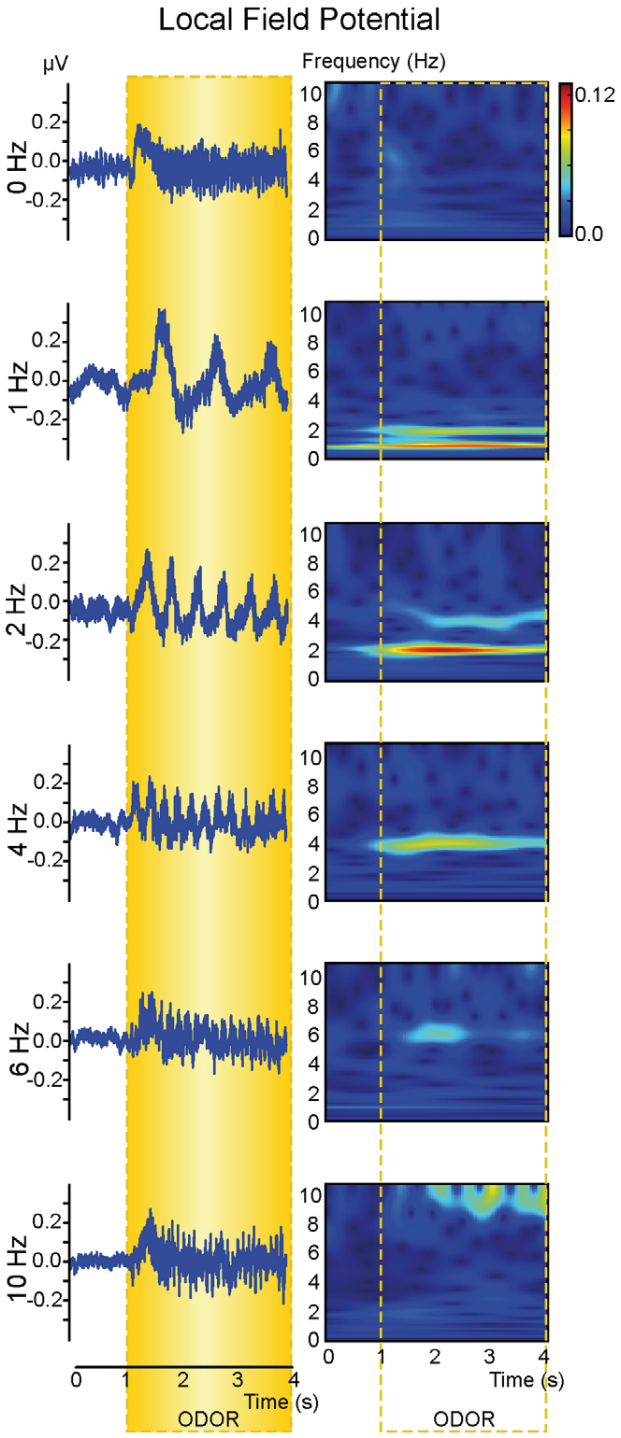


Figure 3. Impact of sniffing frequency on LFP signals. An example of local field potentials recorded from the granule cell layer (left) and corresponding time-frequency representations (right). The responses were recorded using a 1000 ml/min flow rate. The color scale (arbitrary unit) was the same for all time-frequency representations. Yellow box indicates odor stimulation period.
doi:10.1371/journal.pone.0040927.g003

difference can be first explained by our imaging approach. Indeed, all previous studies focusing on the impact of sniffing frequency were based on Ca2+ imaging of presynaptic activity. Voltage-sensitive dyes are primarily used to visualize post-synaptic activity [28], and we could not exclude the hypothesis that input activity could be reshaped by local circuits at the glomerular level, thus maintaining sniffing modulation at the post-synaptic level. External tufted cells are entrained by repetitive sensory input at frequencies of up to 10 Hz [35]. Ensembles of entrained tufted cells of a given glomerulus may synchronize glomerular network activity and amplify rhythmic activity at the sniffing frequency [35,36]. This hypothesis agrees with the LFP data showing that intrinsic OB network activity was still modulated by sniffing at 10 Hz and was confirmed by a recent study showing that mitral cells maintain their sampling-related modulation in high-frequency sniffing [27]. Other methodological issues could be taken into account, such as odor choices [22,24] or the use of a sniffing simulator which reproduce both respiratory phases unlike previously used devices [23,24]. In our anesthetized model, only bottom-up processes could influence OB activity, and we could not rule out that top-down control may explain differences observed with awake model [22,25]. Finally, our quantification analysis revealed sniffing frequency effects that could not be observed by a simple visual observation. Our data confirmed that the sniffing modulation of optical signals decreased with increasing frequency [22,24,25] independent of the imposed flow rate. This decrease could explain the difficulty in observing the sniffing-related modulation of optical signals at 10 Hz, which could be related to a low signal-to-noise ratio. Indeed, rats exhibiting the largest response amplitude also displayed sniffing modulation at 10 Hz. This result and the presence of a phasic component at 10 Hz on LFP signals indicate that the lack of sniffing modulation was not due to temporal filtering by VSDi or a limitation of our artificial sniffing setup.

What is the importance of the persistence of sampling-related dynamics? It has been shown that sniffing behavior is coupled with head movements and whisking, which are also involved in exploratory behavior [37,38]. These rhythms appear in the same frequency band as the hippocampal theta rhythm. Sniffing and theta rhythms not only share similar frequencies but also exhibit phase relationships [39]. Moreover, OB sniffing-related rhythms and/or hippocampal theta rhythms appear to be synchronized during odor sampling [40]. Thus, sniffing or theta rhythms could allow coupling between olfactory structures and other brain regions, and the persistence of sniffing-related activity at high sniffing frequencies could be a key mechanism in communication between brain areas [19].

Tonic and Phasic Components of VSDi Responses are Differentially Affected by Sampling Parameters: do Tonic and Phasic Components Mirror Flow Rate and Inspiration Volume, Respectively?

At high flow rates, the tonic component amplitude of the VSDi responses was independent of sniffing frequency. This result agrees with previous data showing that olfactory nerve terminal response amplitude was only slightly affected by sniffing frequency [23]. These data also agree with results from Cury and Uchida [41] showing that changes in sniffing frequency weakly impact mitral cell discriminability. A major impact of flow rate on OB activity has also been reported in both the mitral cell discharge and LFP oscillation levels [27]. Nevertheless, even if the tonic component amplitude was not affected by sniffing frequency at a high flow rate, increasing frequency leads to a stepwise rising phase before reaching the maximum level, which indicates that maximum receptor activation likely requires cumulative activation across successive respiratory cycles. The effect of sniffing frequency

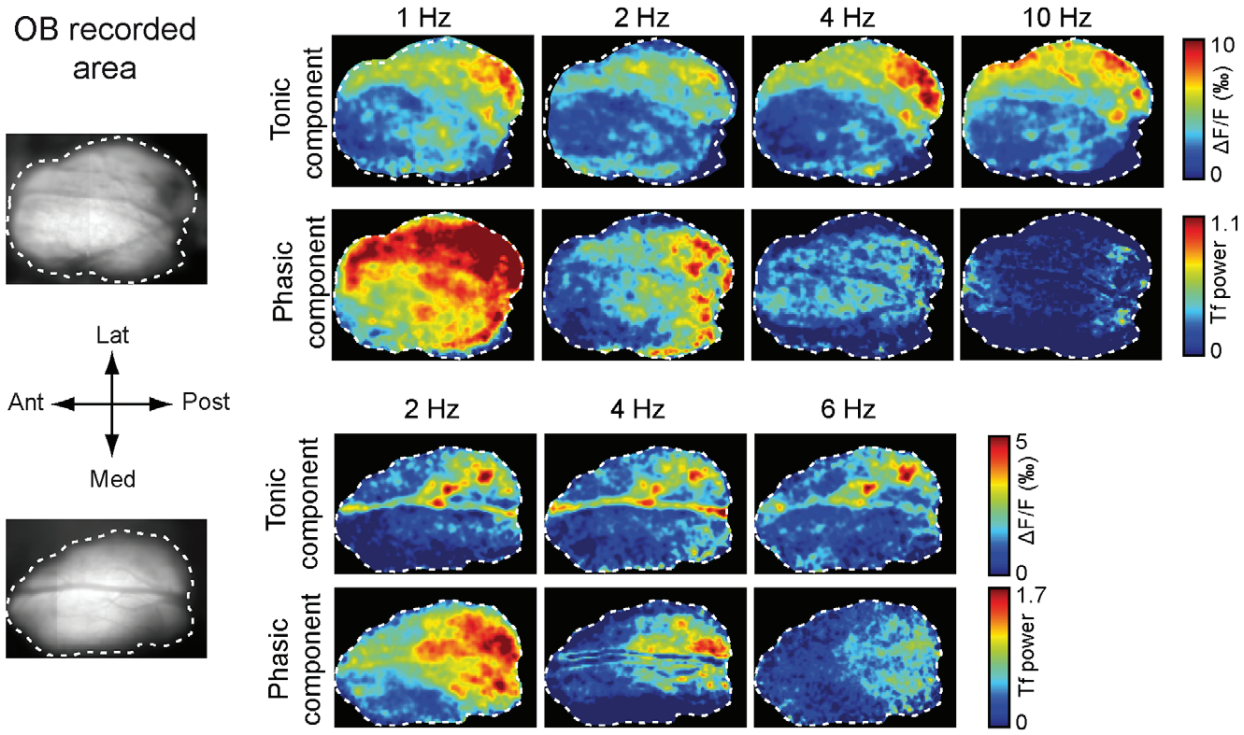


Figure 4. Spatial distribution of the tonic and phasic component amplitudes as a function of sniffing frequency. Two examples of odor-evoked maps computed from two different rats as a function of sniffing frequency. The first column shows the recorded area of the dorsal OB. In each panel, the first row displays the spatial distribution of the odor-evoked activity computed from the early tonic responses (see material and methods), i.e., the early-responding glomeruli. Color scale (arbitrary unit) was the same for all maps in a row. Due to dye bleaching, signal to noise ratio sometimes decreased along the experiment leading to difference in signal amplitude between different maps. The second row displays the spatial distribution of the phasic component amplitude. We performed a pixel-by-pixel time-frequency analysis, and for each pixel, we extracted the maximum power of the time-frequency map in the frequency band of interest. Color scale (arbitrary unit) was the same for all maps in a row.
doi:10.1371/journal.pone.0040927.g004

appeared at moderate and low flow rates, which indicates that the primary impact on the post-synaptic glomerular tonic response is a factor of flow rate rather than frequency. Such a concomitant impact of sniffing flow rate and frequency was not reported by Oka et al. [23], but they only analyzed effect of sniffing frequency at moderate flow rate. In our study, a decrease in tonic component amplitude was only observed for the highest sniffing frequency (10 Hz) when using a moderate flow rate, and the main impact of sniffing frequency was reported for the low flow rate. Our data also showed that the spatial distribution of the tonic component amplitude was only slightly modified by an increase in sniffing frequency using a high flow rate, suggesting that odor spatial representation at the OB input level is stable across the physiological range of sniffing frequencies. Conversely, sniffing frequency highly impacted the phasic response amplitude. Regardless of the flow rate, the phasic component amplitude significantly decreased with increasing frequency. The relationship between the phasic component amplitude and sniffing frequency (Fig. 5C) was similar to the relationship between inspiration volume and sniffing frequency (Fig. S5), which suggests that the sniffing-related modulation of VSDi responses largely depends on the volume of each inspiration. The phasic component was also affected to a lesser extent by flow rate. Even if a decrease in phasic component amplitude with increasing sampling frequency was a general feature of optical responses, a high flow rate helped maintain a higher level of sampling-related modulation.

Taken together, our results suggest that both sniffing parameters jointly affect odor-evoked responses. If increased sniffing frequency could affect the odor-evoked tonic response at moderate and low flow rates, a decrease could be compensated by an increased flow rate; for example, we found that at 10 Hz, an increased flow rate of 1000 ml/min restored the signal amplitude observed at 2 Hz. This synergic effect of flow rate and frequency is in accordance with electrophysiological and behavioral data [27,42].

Conclusions

Using an artificial sniffing paradigm in anesthetized rats, our main goal was to analyze bottom-up influence of sniffing behavior on odor representation at the OB input level. Our data demonstrated that sniffing frequency and flow rate jointly impact the level and the dynamic of glomerular responses. Whereas high sniffing frequency retained the ability to shape OB activity, increasing sniffing frequency has little impact on glomerular response amplitude when combined with a high flow rate. In other words, the post-synaptic representation of odors at the glomerular level could be maintained in high-frequency sniffing if the increase in frequency is compensated by an increase in flow rate. Such a co-variation of both parameters has been observed in behaving rats [21,42]. Thus an animal has the ability to combine various sniffing parameters differently according to the odor, task and/or context. If top-down processes may also influence OB activity in awake animals, such sensory mechanism provides a stabilized odor representation independent of the sniffing behavior adopted by the animal during odor detection or recognition and may help maintain an intensity invariance of the odor representation at the OB input level [18]. As suggested by Schoenfeld and Cleland

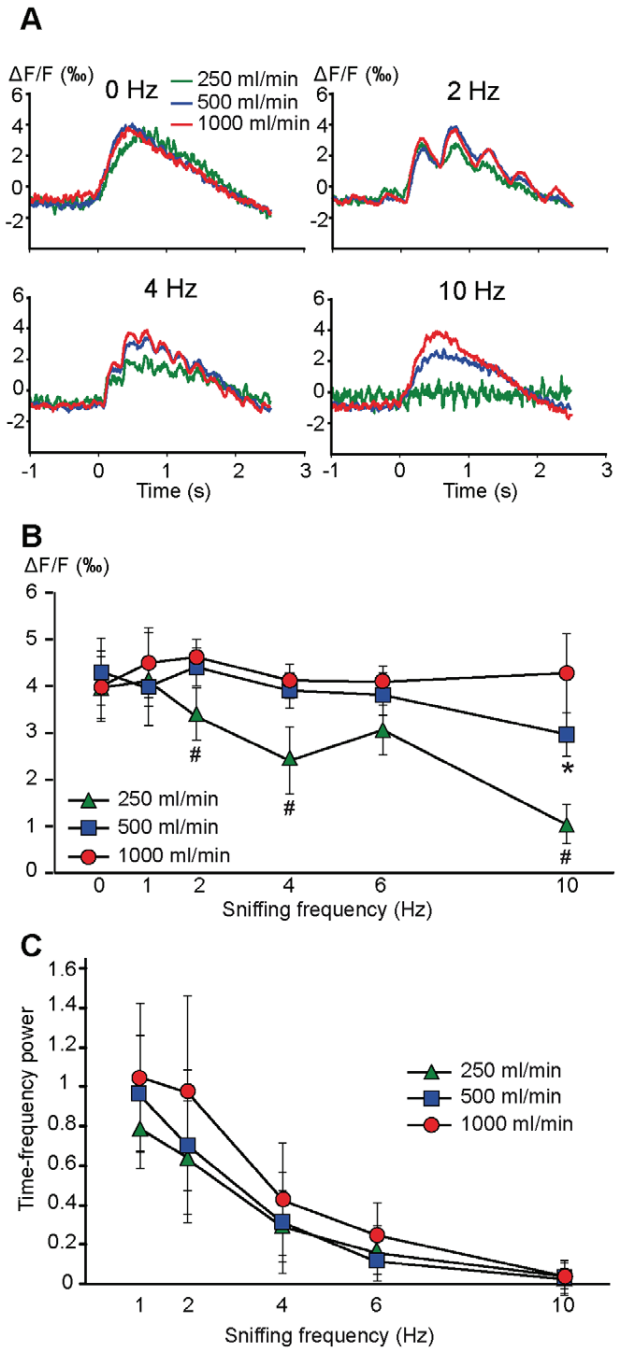


Figure 5. Concomitant effect of sniffing frequency and flow rate. A: Mean optical response as a function of sniffing frequency and flow rate. B: Mean amplitude (±SD) of the tonic component of the optical responses as a function of both flow rate and frequency. (*) and (#) indicate that the amplitude of the tonic response was significantly different for 500 ml/min and 250 ml/min, respectively. C: Mean amplitude (±SD) of the sampling-related modulation (phasic component amplitude) as a function of both sniffing frequency and flow rate.
doi:10.1371/journal.pone.0040927.g005

[43,44], adaptive sampling may also improve olfactory capabilities by allowing the optimization of the deposition of odor molecules through the olfactory epithelium. Such hypothesis agrees with data from Oka et al. [23] showing that flow rate effect depends on the odorant chemical properties. However, if frequency does not alter odor representation, what is the functional role of sniffing behavior? Increased sniffing frequency was not observed in head-restrained models except for the first presentation of a new odorant [25,34]. Increased sniffing frequency was observed in freely moving rats in which the odor is actively delivered to the animal at a precise localization [19,45]. Nevertheless, odor could be identified in one sniff indicating that prolonged high frequency sniffing seems not necessary for odor discrimination in such protocol. A clear modulation of sniffing parameters has been observed in animals that actively sample their environment [21]. Thus, this behavior could be driven by expectation or movement toward an odor source to spatially localize the odor. A fast-sniffing mode could facilitate odor acquisition through the odor plume when tracking an odor source, allowing the rapid detection of fine changes in odor concentration. Rapid sniffing could also allow suppression of background signals, thus helping detect new odorants [25]. Finally, the rapid repetitive sampling of inputs could allow the bulbo-cortical network to construct perceptual hierarchies to use in recognizing environmental odor cues [46].

Materials and Methods

Ethics Statement

Animal protocols were conducted in agreement with the French (council directive 87848, October 19, 1987) and international (directive 86-609, November 24, 1986, European Community) legislation for animal experiments, and received approval from the Lyon 1 University Ethics Committee (permission #69387473). Care was taken at all stages to minimize stress and discomfort to the animals.

Subjects

Male Wistar rats (Centre d'Elevage et de Recherche Janvier, Le Genest-St-Isle, France) weighing 220–260 g were housed in standard rat cages (polycarbonate, 49×26×20 cm) in a temperature-controlled vivarium with a 12 h reverse light cycle (light on at 8:00 P.M.). All rats were given access to food and water.

Surgery

Animals were anesthetized using urethane (1.5 g/kg i.p., with additional supplements as needed). Body temperature was maintained between 36.5°C and 37.5°C using a heating pad and rectal probe. To control sniffing parameters, the trachea was incised and cannulated with two tubes, a tracheal cannula leading to the lung (Catheter Biotrol, internal diameter 1.57 mm, external diameter 2.08 mm) and nasal cannula leading to the postnasal cavity through the pharynx (catheter Vygon, Venolux 247, internal diameter 0.8 mm). After double cannulation, rats were fixed on a stereotaxic frame, and using a dental drill, the skull overlying the dorsal surface of the OB was thinned and then removed. The dura matter was carefully removed using a tungsten wire.

Dye Staining

A plastic chamber (external diameter 8 mm, internal diameter 5 mm, height 1 mm) was fixed on the skull using dental cement (Unifast Trad), and was then filled with dye solution. The dye used was RH-1838 (Optical Imaging Inc.), which is a blue oxonol dye shown to work well in the rat OB [28]. This dye molecule transforms changes in membrane potential into optical signals that occur in microseconds allowing to record neural activity with millisecond precision [47,48]. The dye was dissolved in artificial cerebrospinal fluid (aCSF, Phymep) until the dye-containing

solution had an optical density of 4–7 measured at 580 nm. The OB was stained for 2–2.5 hr. At the end of the staining, the chamber and olfactory bulb were rinsed, and the chamber was filled with 1.5% agarose and enclosed with a cover glass.

Optical Imaging

The olfactory bulb surface was illuminated using an epi-illumination system with a 630 nm interference filter for excitation (bandwidth of 30 nm), a dichroic mirror (650 DLRP), and a 665 nm long-pass filter for emission. Images were acquired using a commercial brain imager (imager 3001/M, Optical Imaging Inc.) mounted on a tandem photo lens system (Nikkor 50 mm, f = 1.2 and Nikkor 135 mm, f = 2), leading to a 2.7x magnification. Images were spatially binned 4×4 (final pixel size 20×20 μm) and digitized at 160 Hz. Each trial consisted of two consecutive blocks of images (5 sec) triggered on the rat's tracheal respiration, the C0 control block and the C1 test block. During C0, neither airflow nor odorant stimulation was applied through the nasal cavity during OB imaging. During C1, the odor was applied through an artificial sniff as described below. For each condition, five trials were averaged to increase the signal-to-noise ratio.

Electrophysiological Recordings

Bulbar activity was recorded as a broadband signal (0.1 Hz to 5 kHz) using 16-channel silicon probes (NeuroNexus Technologies, Ann Arbor, MI) and a homemade 16-channel DC amplifier (gain 1000x). The 16-channel silicon probes were placed to ensure the ability to record the maximum LFP amplitude of the granular cell layer. The granular cell layer was located by the LFP waveform, as described by Buonviso et al. [12]. Recordings were performed in the whole antero-posterior axis of the OB. Data were digitally sampled at 20 kHz and acquired with a PC using a National Instrument acquisition card (BNC-2111).

Odor Stimulation

Odors (isoamyl acetate (ISO), 2-heptanone (K07), hexanal (D06), and ethyl butyrate (BUT), Sigma Aldrich, Fluka) were delivered to the front of the animal's nose using a custom-built flow dilution olfactometer with a concentration of ~5.10-2 of saturated vapor and at a rate of 1 L/min. The recording protocol was as follows: 2 s of pre-stimulus recording, 2 s of olfactory stimulation recording and 1 s of post-stimulus recording. For LFP experiments, the recording period consisted of 2 s of pre-stimulus recording, 5 s of olfactory stimulation recording and 1 s of post-stimulus recording. The time delay between each odor presentation was at least 2 min.

Imposed Nasal Airflow Protocol

To simulate respiratory cycles, we used a homemade apparatus that allowed the reproduction of both inhalation and exhalation phases [13]. To study the influence of airflow variation, we chose to impose three nasal airflow rates: low (250 ml/min), moderate (500 ml/min) and high (1000 ml/min). We also varied the sampling frequency by using values of 1, 2, 4, 6 or 10 Hz and a continuous nasal airflow (referred to as 0 Hz in the experiments) (Fig. S2). These flow rates and sampling frequencies corresponded with the physiological range of rats [21,49]. The respiratory cycle simulator was triggered by the start of data acquisition.

Animal respiration was measured by a sensor placed in front of the tracheal cannula (Fig. S2). Actual airflow circulating through the nasal cavity was measured by a second sensor placed at the entry of the nostril. We used fast response time airflow sensors (bidirectional micro bridge mass airflow sensor, AWM 2000 series, Honeywell®). This setup has been previously described in detail [29].

Data Processing

Data processing was performed using OpenElectrophy open-access homemade software [50]. OpenElectrophy is open source and freely available for download at http://neuralensemble.org/trac/OpenElectrophy. All signals and epochs (i.e., with or without odor) were stored in an SQL database.

Optical data processing. For each trial and pixel, the frame average over the first 200 ms was defined as the baseline fluorescence (F). This value was used to convert raw images to images that corresponded with the relative changes in fluorescence (ΔF/F). The optical signal was then detrended to eliminate fluorescence decrease due to bleaching.

Odor-evoked maps were computed after averaging five consecutive trials and low-pass filtering of the resulting signal (0–20 Hz). Maps were defined as the difference between the odor stimulation period and one-second pre-stimulus period. One to three different regions of interest (ROI) were defined for each odor. They corresponded to early-responding glomeruli (the first 50 ms after odor presentation) using a 2 Hz sniffing frequency and 1000 ml/min flow rate. These ROIs were used to compute the optical signal time-course for all other frequencies and flow rates. The amplitude of the tonic component (see Fig. 1) of each computed optical response was defined as the maximum fluorescence increase.

Analysis of the optical signal dynamics. Superimposed onto the tonic component, the VSDi signals also presented a phasic component linked to sniffing rate [28]. To preserve both time and frequency information, we used a time-frequency representation (TFR) based on a continuous wavelet transform. TFRs were constructed during the spontaneous and odor-evoked activities for each sniffing condition. Optical signals had no unit as they corresponded to relative changes in fluorescence (ΔF/F). In consequence, time-frequency power was expressed in arbitrary unit. To access the amplitude of the sniffing-related component, the maximum TFR power in each sniffing band of interest (i.e., 1, 2, 4, 6 and 10 Hz) was detected. This maximum was also detected in each sniffing band of interest in the 0 Hz (continuous flow rate) condition. This condition was used to evaluate the frequency content of the tonic component response. Then, the mean (±SEM) of the VSDi sniffing-related modulation was calculated and compared with the mean of the 0 Hz condition (e.g., the maximum value detected in the 2 Hz frequency band for the trial using a 2 Hz artificial sniffing frequency was compared with the maximum value detected in the same frequency band for the trial using a 0 Hz artificial sniffing frequency). This allowed us to determine the presence or absence of sniffing-related modulation.

The spatial distribution of the respiratory-related modulation was analyzed using a pixel-by-pixel time-frequency analysis. For each pixel, we extracted the maximum power of the time-frequency map in the frequency band of interest. For example, for a 2 Hz sniffing frequency, we computed the time-frequency representation at each point and plotted the maximum power at 2 Hz (±0.1 Hz). These values were used to represent the dorsal OB sniffing modulation map.

LFPs analysis. LFPs were analyzed after band-passing the signal at 0–200 Hz. Then, the TFR of the LFP signals were computed to visualize the sniffing-related modulation amplitude. The TFR was computed using the same parameters as the optical responses, and the presence of a phasic component was evaluated by comparing the sampling-related modulation amplitude in each

frequency band of interest with the frequency content of the 0-Hz-evoked response (see above).

Statistical Analyses

Data from 20 rats were included in data analysis for a total of 536 recordings. To analyze the maximum signal variation, a two-way analysis of variance (ANOVA) was used with flow rate (250 ml/min vs. 500 ml/min vs. 1000 ml/min) and frequency (0 Hz vs. 1 Hz vs. 2 Hz vs. 4 Hz vs. 6 Hz vs. 10 Hz) as factors. Partial ANOVAs and Student-Newman-Keuls post hoc tests complemented the analysis when appropriate. The threshold for rejecting the null hypothesis was 0.05. For sniffing-related modulations, each maximum value detected in the frequency band of interest was compared with the maximum value detected in the same band for the 0 Hz condition using a one-way ANOVA with the sniffing frequency (0 Hz vs. 1 Hz; 0 Hz vs. 2 Hz; 0 Hz vs. 4 Hz; 0 Hz vs. 6 Hz; and 0 Hz vs. 10 Hz) as factor.

Supporting Information

Figure S1 Nasal airflow measurements. Examples of imposed airflow recorded at the nostril entrance (see figure S2) at different frequencies and flow rates. The actual sniffing frequency through the nostril perfectly fitted with imposed sampling, and the actual flow rate remained proportional to the imposed flow rate across the entire frequency range.
(TIF)

Figure S2 Description of the experimental paradigm. Airflow through the nose was imposed via the nasal cannula allowing to mimic rat sniffing behavior. As in previous experiments in freely breathing rats [12,15], odor was delivered in front of the nostril via a custom-built olfactometer. Odor sampling was imposed by nasal airflow. Airflow circulating through the nasal cavity was measured by a sensor placed at the entry of the nostril. Such device did not allow to record absolute flow rate because airtightness around the nostril was not total. Nevertheless, airflow measurement was directly proportional to absolute airflow [29].
(TIF)

Figure S3. Amplitude of the sampling-related modulation. A: Distribution of the averaged amplitude (±SD) (gray bars) of sniffing related modulation for VSDi signals according to sniffing frequency. Averaged values were computed from all raw time-frequency representations from which the maximum power in each frequency band of interest was extracted. The open bars correspond to the frequency content in each frequency band of the tonic response evoked by continuous flow (0 Hz, n = 59) in the nasal cavity. The phasic component amplitude of optical responses was significantly larger than the frequency content of the tonic component for 1 Hz (n = 65), 2 Hz (n = 151), 4 Hz (n = 123), and 6 Hz (n = 75) but not 10 Hz (n = 63) (see main text). B: Similar results were obtained for the LFP recordings, excluding the 10 Hz imposed frequency, which remained able to induce a phasic component significantly higher than the 10 Hz tonic component content ($F_{(1,72)} = 41.1$, $P<0.0001$).
(TIF)

Figure S4 VSDi signal modulation at a 10 HZ sniffing frequency. An example of a raw signal (left) that exhibited a sniffing related modulation at a 10 Hz sampling frequency. This modulation was confirmed by the time-frequency representation (right). Time-frequency power (arbitrary unit) is color-coded. It should be noted that this optical signal has a high signal-to-noise ratio (around 1%).
(TIF)

Figure S5 Relationship between sampling frequency and inspiration volume. The inspiration volume for each breathing cycle was directly proportional to the sampling frequency. Theoretical volumes were normalized relative to the inspiration volume at a 1 Hz sniffing frequency and 1000 ml/min flow rate.
(TIF)

Table S1 Tonic component amplitude as a function of sniffing frequency and flow rate. Mean ± SD of the tonic component amplitude computed as a function of sniffing frequency and flow rate. Number of signals in each group is indicated between brackets.
(DOC)

Table S2 Phasic component amplitude as a function of sniffing frequency and flow rate. Mean ± SD of the phasic component amplitude computed as a function of sniffing frequency and flow rate. Number of signals in each group is the same than in table S1.
(DOC)

Acknowledgments

The authors would like to thank Dr. Frédéric Chavane for his extensive and helpful advice regarding voltage-sensitive dye imaging.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: FE PL NB. Performed the experiments: FE EC PL. Analyzed the data: FE EC PL. Contributed reagents/materials/analysis tools: MT SG. Wrote the paper: FE PL.

References

1. Kaas JH (1997) Topographic maps are fundamental to sensory processing. Brain Res Bull 44: 107–112.
2. Hudson R, Distel H (1987) Regional autonomy in the peripheral processing of odor signals in newborn rabbits. Brain Res 421: 85–94.
3. Jourdan F, Duveau A, Astic L, Holley A (1980) Spatial distribution of [14C]-2-deoxyglucose uptake in the olfactory bulbs of rats stimulated with two different odours. Brain Res 188: 139–154.
4. Sharp FR, Kauer JS, Shepherd GM (1975) Local sites of activity-related glucose metabolism in rat olfactory bulb during olfactory stimulation. Brain Res 98: 596–600.
5. Slotnick BM, Graham SJ, Laing DG, Bell GA (1987) Detection of propionic acid vapor by rats with lesions of olfactory bulb areas associated with high 2-DG uptake. Brain Res 417: 343–346.
6. Johnson BA, Leon M (2007) Chemotopic odorant coding in a mammalian olfactory system. J Comp Neurol 503: 1–34.
7. Martin C, Grenier D, Thévenet M, Vigouroux M, Bertrand B, et al. (2007) fMRI visualization of transient activations in the rat olfactory bulb using short odor stimulations. Neuroimage 36: 1288–1293.
8. Takahashi YK, Kurosaki M, Hirono S, Mori K (2004) Topographic representation of odorant molecular features in the rat olfactory bulb. J Neurophysiol 92: 2413–2427.
9. Wilson RI, Mainen ZF (2006) Early events in olfactory processing. Annu Rev Neurosci 29: 163–201.
10. Adrian ED (1950) The electrical activity of the mammalian olfactory bulb. Electroencephal Clin Neurophysiol 2: 377–388.
11. Buonviso N, Amat C, Litaudon P (2006) Respiratory modulation of olfactory neurons in the rodent brain. Chem Senses 31: 145–154.
12. Buonviso N, Amat C, Litaudon P, Roux S, Royet JP, et al. (2003) Rhythm sequence through the olfactory bulb layers during the time window of a respiratory cycle. Eur J Neurosci 17: 1811–1819.
13. Courtiol E, Amat C, Thevenet M, Messaoudi B, Garcia S, et al. (2011) Reshaping of bulbar odor response by nasal flow rate in the rat. PLoS One 6: e16445.
14. Litaudon P, Amat C, Bertrand B, Vigouroux M, Buonviso N (2003) Piriform cortex functional heterogeneity revealed by cellular responses to odours. Eur J Neurosci 17: 2457–2461.

15. Litaudon P, Garcia S, Buonviso N (2008) Strong coupling between pyramidal cell activity and network oscillations in the olfactory cortex. Neuroscience 156: 781–787.
16. Macrides F, Chorover SL (1972) Olfactory bulb units: activity correlated with inhalation cycles and odor quality. Science 175: 84–87.
17. Wilson DA (1998) Habituation of odor responses in the rat anterior piriform cortex. J Neurophysiol 79: 1425–1440.
18. Johnson BN, Mainland JD, Sobel N (2003) Rapid olfactory processing implicates subcortical control of an olfactomotor system. J Neurophysiol 90: 1084–1094.
19. Kepecs A, Uchida N, Mainen ZF (2006) The sniff as a unit of olfactory processing. Chem Senses 31: 167–179.
20. Mainland J, Sobel N (2006) The sniff is part of the olfactory percept. Chem Senses 31: 181–196.
21. Youngentob SL, Mozell MM, Sheehe PR, Hornung DE (1987) A quantitative analysis of sniffing strategies in rats performing odor detection tasks. Physiol Behav 41: 59–69.
22. Carey RM, Verhagen JV, Wesson DW, Pirez N, Wachowiak M (2009) Temporal structure of receptor neuron input to the olfactory bulb imaged in behaving rats. J Neurophysiol 101: 1073–1088.
23. Oka Y, Takai Y, Touhara K (2009) Nasal airflow rate affects the sensitivity and pattern of glomerular odorant responses in the mouse olfactory bulb. J Neurosci 29: 12070–12078.
24. Spors H, Wachowiak M, Cohen LB, Friedrich RW (2006) Temporal dynamics and latency patterns of receptor neuron input to the olfactory bulb. J Neurosci 26: 1247–1259.
25. Verhagen JV, Wesson DW, Netoff TI, White JA, Wachowiak M (2007) Sniffing controls an adaptive filter of sensory input to the olfactory bulb. Nat Neurosci 10: 631–639.
26. Carey RM, Wachowiak M (2011) Effect of sniffing on the temporal structure of mitral/tufted cell output from the olfactory bulb. J Neurosci 31: 10615–10626.
27. Courtiol E, Hegoburu C, Litaudon P, Garcia S, Fourcaud-Trocme N, et al. (2011) Individual and synergistic effects of sniffing frequency and flow rate on olfactory bulb activity J Neurophysiol 106: 2813–2824.
28. Spors H, Grinvald A (2002) Spatio-temporal dynamics of odor representations in the mammalian olfactory bulb. Neuron 34: 301–315.
29. Roux SG, Garcia S, Bertrand B, Cenier T, Vigouroux M, et al. (2006) Respiratory cycle as time basis: an improved method for averaging olfactory neural events. J Neurosci Meth 152: 173–178.
30. Belluscio L, Katz LC (2001) Symmetry, stereotypy, and topography of odorant representations in mouse olfactory bulbs. J Neurosci 21: 2113–2122.
31. Fletcher ML, Masurkar AV, Xing J, Imamura F, Xiong W, et al. (2009) Optical imaging of postsynaptic odor representation in the glomerular layer of the mouse olfactory bulb. J Neurophysiol 102: 817–830.
32. Rubin DD, Katz LC (2001) Spatial coding of enantiomers in the rat olfactory bulb. Nat Neurosci 4: 355–356.
33. Freeman WJ, Viana Di Prisco G, Davis GW, Whitney TM (1983) Conditioning of relative frequency of sniffing by rabbits to odors. J Comp Psychol 97: 12–23.
34. Wesson DW, Carey RM, Verhagen JV, Wachowiak M (2008) Rapid encoding and perception of novel odors in the rat. PLoS Biol 6: e82.
35. Hayar A, Karnup S, Ennis M, Shipley MT (2004) External tufted cells: a major excitatory element that coordinates glomerular activity. J Neurosci 24: 6676–6685.
36. Hayar A, Karnup S, Shipley MT, Ennis M (2004) Olfactory bulb glomeruli: external tufted cells intrinsically burst at theta frequency and are entrained by patterned olfactory input. J Neurosci 24: 1190–1199.
37. Komisaruk BR (1970) Synchrony between limbic system theta activity and rhythmical behavior in rats. J Comp Physiol Psychol 70: 482–492.
38. Welker WI (1964) Analysis of sniffing of the albino rat. Behavior 22: 223–244.
39. Macrides F, Eichenbaum HB, Forbes WB (1982) Temporal relationship between sniffing and the limbic θ rhythm during odor discrimination reversal learning. J Neurosci 2: 1705–1717.
40. Kay LM (2005) Theta oscillations and sensorimotor performance. Proc Natl Acad Sci U S A 102: 3863–3868.
41. Cury KM, Uchida N (2010) Robust odor coding via inhalation-coupled transient activity in the mammalian olfactory bulb. Neuron 68: 570–585.
42. Walker JK, Lawson BL, Jennings DB (1997) Breath timing, volume and drive to breathe in conscious rats: comparative aspects. Respir Physiol 107: 241–250.
43. Schoenfeld TA, Cleland TA (2005) The anatomical logic of smell. Trends Neurosci 28: 620–627.
44. Schoenfeld TA, Cleland TA (2006) Anatomical contributions to odorant sampling and representation in rodents: zoning in on sniffing behavior. Chem Senses 31: 131–144.
45. Uchida N, Mainen ZF (2003) Speed and accuracy of olfactory discrimination in the rat. Nat Neurosci 6: 1224–1229.
46. Ambros-Ingerson J, Granger R, Lynch G (1990) Simulation of paleocortex performs hierarchical clustering. Science 247: 1344–1348.
47. Grinvald A, Hildesheim R (2004) VSDI: a new era in functional imaging of cortical dynamics. Nat Rev Neurosci 5: 874–885.
48. Shoham D, Glaser DE, Arieli A, Kenet T, Wijnbergen C, et al. (1999) Imaging cortical dynamics at high spatial and temporal resolution with novel blue voltage-sensitive dyes. Neuron 24: 791–802.
49. Hegoburu C, Shionoya K, Garcia S, Messaoudi B, Thevenet M, et al. (2011) The RUB Cage: Respiration-Ultrasonic Vocalizations-Behavior Acquisition Setup for Assessing Emotional Memory in Rats. Front Behav Neurosci 5: 25.
50. Garcia S, Fourcaud-Trocme N (2009) OpenElectrophy: An Electrophysiological Data- and Analysis-Sharing Framework. Front Neuroinformatics 3: 14.

6.2 Posters

ECRO(2009)

How nasal airflow shapes odor representation at the olfactory bulb level.

Emmanuelle Courtiol, Marc Thevenet, Belkacem Messaoudi, Samuel Garcia, Nathalie Buonviso.

Olfactory sense and respiration are intimately related: odorant molecules reach receptor cells in the olfactory epithelium in a periodic way, with inspiration. A strong respiration-shaped activation has been evidenced by imaging methods in the glomerular layer (Spors et al., 2006). Mitral cell activity is also paced by respiration (Buonviso et al., 2006). Such respiratory-modulated activation has been observed even without any odorant stimulation (Adrian, 1942) so that a possible mechanical effect of air on receptor cells has been hypothesized. It has been recently evidenced that olfactory receptor cells are sensitive to the intranasal air pressure (Grosmaitre et al., 2007). We wanted to know whether nasal airflow, by its mechanical stimulation, can influence olfactory bulb activity so that the representation of an odor at the bulbar level would be different according to respiratory dynamics.For this purpose, we used a double canulation protocol on anesthetized rats in order to make nasal airflow sampling independent from animal respiration. Thanks to this technique, we were able to test different parameters of the nasal airflow as the frequency or the strength of inhalation flow. Both extracellular unitary activity of mitral cells and local field potential (LFP) were recorded during different conditions of respiratory dynamics.Preliminary results show that mitral cell spontaneous- and odor-evoked activities varied with respiratory dynamics. Airflow tended to synchronize mitral cell activity with respiratory cycle in 27% of cells. But such air sensitivity did not confer those cells any particular odor response properties. LFP oscillations were also modified by inspiration strength: a low inhalation flow more often evoked beta oscillations (15-35Hz) while a high inhalation flow induced more often gamma oscillations (35-90Hz). Amplitude, frequency and duration of beta and gamma oscillatory episodes were modified according to inhalation flow. Moreover, spikes/LFP relationships were modified by inspiration strength. Results concerning the effect of respiration frequency onto bulbar activity are in progress.

All these results show that intranasal air dynamics plays a critical role in shaping odor representation at the bulbar level. Since sniffing behavior in the freely moving rodent has been shown to be highly dynamic and to vary with behavioral context (Wesson et al., 2008), it is likely that representation of an odor at the bulbar level continuously changes according to the animal behavior.

How nasal airflow shapes odor representation at the olfactory bulb level

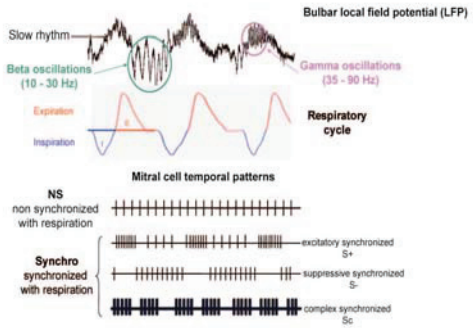
Emmanuelle Courtiol, Marc Thévenet, Belkacem Messaoudi, Samuel Garcia, Nathalie Buonviso

Université de Lyon, F-69622, Lyon, France; Université Lyon 1 (UCBL1), Villeurbanne

CNRS, UMR 5020, Neurosciences sensorielles, comportement,cognition; Institut fédératif des neurosciences de Lyon

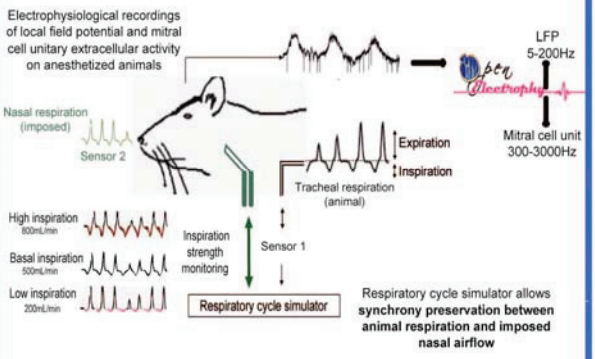
Introduction

In the mammal, respiration and odor sampling are indissociable mechanisms : odorant molecules rhythmically reach olfactory epithelium at each inspiration. Consequently olfactory bulb (OB) activity is highly punctuated by respiratory dynamics.



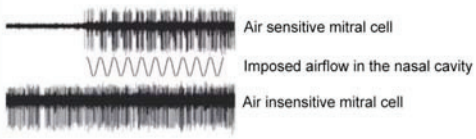
Aim : we wanted to characterize and quantify effects of nasal airflow presence and inspiration strength on OB activity. If OB activity response to odors is modified by nasal airflow dynamics, then we could conclude that representation of odors in the OB is shaped by respiratory dynamics.

Materials and Methods

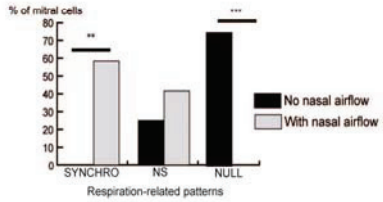


Results

I) 27% of recorded mitral cells are sensitive to nasal airflow



II) Nasal airflow imposes a rhythm to air sensitive mitral cells

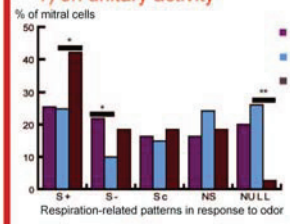


Mitral cell respiration-related patterns are imposed by airflow dynamics into the nasal cavity

Results

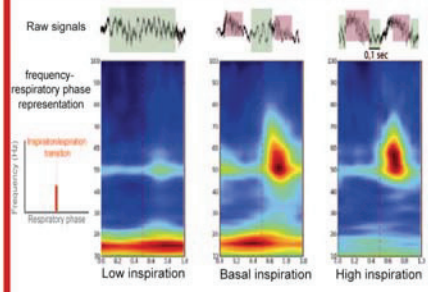
III) Influence of inspiration strength

1) on unitary activity

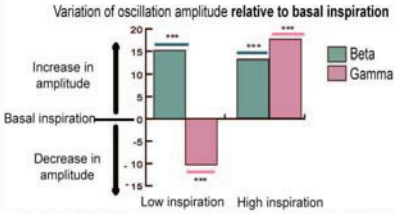


- **Low inspiration** favors **S-** pattern.
- **High inspiration** favors **S+** pattern and increases mitral cell responses to odor.

2) on local field potential oscillations



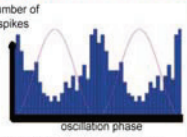
- **Low inspiration** favors the occurence of **Beta oscillations**
- **High inspiration** favors the occurence of **Gamma oscillations** compared to basal inspiration.



Duration, frequency and amplitude of oscillations are also significantly modified by inspiration strength.

3) on the phase-locking between unitary and populational activities

a) Spikes distribution during an oscillation cycle



Unitary events were time stamped. An absolute phase was assigned to each spike occuring during an oscillatory epoch allowing the analysis of spikes/oscillation phase-locking.

b) Determination of phase-locking index

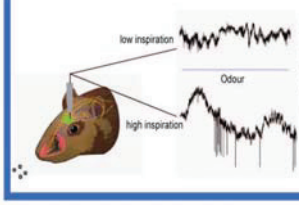
To test dispersion of spikes distribution relative to oscillation phase in each inspiration condition, we compared the circular standard deviation of spikes distribution. The lowest the circular standard deviation is, the strongest spikes/oscillations phase-locking is.

c) Spikes/oscillations phase-locking for different inspiration strength conditions



A **high inspiration** favors a stronger **spikes/gamma phase-locking** whereas a **low inspiration** favors a stronger **spikes/beta phase-locking**.

Conclusion



Nasal airflow imposes a temporal frame to OB activity by modifying mitral cell unitary discharge, network oscillations and spikes/oscillations relation.

These results highlight the importance of respiratory dynamics in the behaving animal. Indeed, an active sniffing behavior probably induces a constant remodeling of odor representation at the OB level.

FENS (2010)

Current source-density (CSD) analysis of respiration-related slow rhythm and fast beta and gamma oscillatory rhythms in the olfactory bulb of freely breathing rats.

Nicolas Fourcaud-Trocmé, **Emmanuelle Courtiol,** Nathalie Buonviso

Mammalian olfactory bulb (OB) local field potentials (LFP) are characterized by a slow (thêta, 2-10Hz), respiration locked, rhythm on which are superimposed two fast LFP oscillatory rhythms (beta, 15-30Hz, and gamma, 40-90Hz). All of these rhythms are implicated in olfactory coding and have been shown to depend on animal state and experience. Thus understanding how these rhythms are generated at early cortical stages is of great importance. However, their origins remain poorly understood. Particularly, neither the neural network nor underlying mechanisms involved in beta/gamma switching are known. In this study, we used a combination of current-source density analysis and multi-unit activity recordings to shed light on these questions in a freely breathing anesthetized rat.

First, we observed the existence of both a peripheral and a centrifugal component in the slow LFP rhythm. Second, we observed that fast beta and gamma rhythms were generated during different epochs of the odor-evoked slow rhythm and that they involved different networks of the OB. In particular, gamma oscillations occurred at the maximal amplitude of the slow rhythm, involved only a small fraction of the granule cell population and appeared to be generated by local interactions in the OB. In contrast, beta oscillations were generated when the slow rhythm was lower in amplitude, and they involved a larger fraction of the granule cell population suggesting the involvement of long-range intrabulbar interactions. Finally, to better understand how the switch between beta and gamma oscillations is controlled by the balance between peripheral and centrifugal components of the slow rhythm, we performed a CSD analysis in tracheotomized rats which allowed us to uncouple nasal airflow (peripheral input) from ongoing respiratory rhythm (putative centrifugal input). Data are in progress.

Current source-density (CSD) analysis of theta, beta and gamma LFP oscillations in the olfactory bulb of freely breathing anesthetized rat.

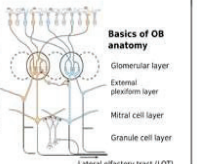
Nicolas Fourcaud-Trocmé, Emmanuelle Courtiol and Nathalie Buonviso

Université de Lyon, F-69366, Lyon, France; Université Lyon 1; CNRS, UMR5020, Neurosciences sensorielles comportement cognition.

Introduction

Mammalian olfactory bulb (OB) dynamics are characterized by a slow (theta, 2-10Hz), respiration locked, local field potential (LFP) rhythm on which are superimposed two fast LFP oscillatory rhythms (beta, 15-30Hz, and gamma, 40-90Hz). All of these rhythms are implicated in olfactory coding and have been shown to depend on animal state and experience. Thus understanding these rhythms is of a great importance to understand olfactory coding at early cortical stages. However, their underlying origins remain poorly understood. Particularly, neither the neural network nor underlying mechanisms involved in beta/gamma switching are known.

In this study, we used a combination of current-source density (CSD) analysis and multi-unit activity (MUA) recordings to shed light on these questions in a freely breathing or tracheotomized anesthetized rat. In particular, we observed that fast beta and gamma rhythms are generated during different epochs of the odor-evoked slow rhythm, they involve different networks of the OB and are differentially modulated by peripheral and centrifugal inputs to the OB.



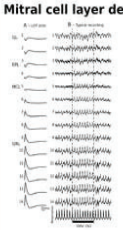
Methods

Electrophysiological recordings

* Recordings have been obtained in 30 male whistar rats with urethane anesthesia (which conserve all oscillatory regimes)
* After a craniotomy above the OB, silicon probes (16 aligned channels, 50µm or 100µm spaced, Neuronexus) where gradually descended vertically into the left OB medial part until the ventral mitral cell layer was close to the middle electrode.

* Odors were presented with an homemade olfactometer at 10% of vapor pressure (dilution in air). Presented results are independent of odor quality.
* The respiratory rhythm was monitored in the contralateral nostril.
* In the last figure, we present experiments where nasal and tracheal air flows have been uncoupled via a tracheotomy.

Mitral cell layer determination



Example of a recording from 14 aligned electrodes, perpendicularly to OB layers. Glomerular layer is in 1 and granule layer is in 14.

A: response to a brief electrical stimulation of the lateral olfactory tract (LOT). We observe an inversion of the signal close to electrode 5

B: Typical recording during experiment. We observe during spontaneous activity an inversion of the slow respiratory rhythm close to electrode 5. During stimulation, the inversion is in the glomerular layer.

Mitral cell layer is given by the signal inversion following a LOT stimulation or during spontaneous activity.

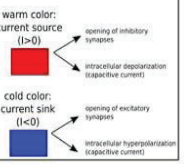
CSD Calculation

Current source density calculation [1] is based on Ohm law. We assume the distribution of sources and sinks is invariant in the (x,y) plane (parallel to the layers) [2]. Thus we have:

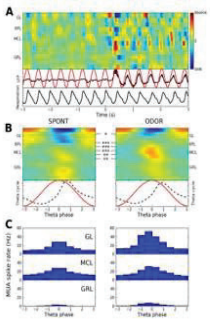
$$\frac{V(z-a\Delta z,t)-2V(z,t)+V(z+a\Delta z,t)}{2a\Delta z}\sim -I(z,t)$$

where V is the LFP and I is the current source/sink at depth z and time t, a= 2 and Δz is the interelectrode distance.
Note: when considering a specific frequency band, V was filtered in this band before CSD calculation

CSD Interpretation



Respiratory modulation at theta frequency



Theta oscillation CSD and MUA analysis

A: *Top*: Example of CSD map computed before and during odor presentation (odor onset at t=0, signal filtered 0.5-5Hz). Granule layer is at the bottom. *Middle*: Raw LFP recorded from electrode 14 (black) and theta LFP oscillations (red, automatically detected using a Morlet frequency map analysis [3]). *Bottom*: Respiratory signal (inspiration: downward, expiration: upward)

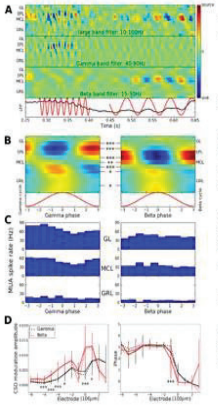
B: CSD maps averaged across theta cycles during spontaneous activity (left) or odor stimulation (right

C: multi unit activity (MUA) in glomerular layer (GL), mitral cell layer (MCL) and granule cell layer (GRL)

Spontaneous activity (left): two clear current sources in the mitral cell layer and granule cell layer due to cell body depolarization (confirmed by the related increase in multi unit activity).

Odor presentation (right): the mitral cell layer source extend to external plexiform layer due to a large increase of cell depolarizations.

Beta and Gamma oscillations activate different networks



Beta and gamma oscillation CSD analysis

A: Example of LFP (bottom, black trace) and the corresponding CSD (top) recorded in response to odor stimulation. Detected gamma and beta oscillations are plotted in red (bottom). The CSD are computed in three frequency bands to emphasize the different sources and sinks during gamma or beta oscillations.

B/C: Gamma (left) and beta (right) CSDs (**B**) and MUAs (**C**) averaged across 16 animals show different spatio-temporal pattern of sinks and sources. Note these maps are obtained after LFP band-pass filtering and thus only display sinks and sources relatively to the baseline given by the slow rhythm

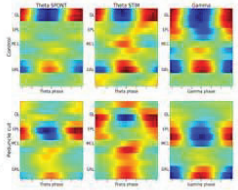
D: CSD amplitude and phase (recordings with 100µm spaced electrodes)

We observe that gamma oscillation sinks and sources involve higher part of the external plexiform layer (EPL). Conversely beta oscillations involve only the lower part of the EPL but deeper granule cells participate to the beta rhythm.

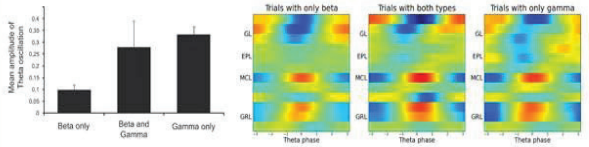
Peripheral and centrifugal input effects

Peripheral input: interruption of the peripheral input (nostril closure or tracheotomy) abolishes completely the slow LFP modulation. However, about 9% of spontenaously spiking mitral cells are still locked to the respiratory rhythm.

Centrifugal input (preliminary results)**:** peduncle section (which cut most of the centrifugal fibers to the OB) prevented the apparition of beta oscillations (similarly to [4]) but not slow or gamma oscillations. However, CSD maps (see figure on the right) are modified compared to control. Note, in the future, the MCL electrode has to be confirmed by histological localization.



Correlation between slow oscillation and fast oscillations

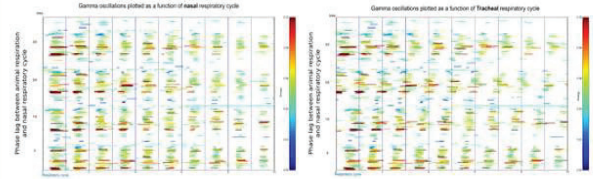


Theta oscillation amplitude correlates with fast oscillation occurrence

Trials showing only beta oscillations, gamma oscillations or both types have been grouped to compute the amplitude of the theta oscillation (left) or its CSD map during odor presentation (right)

We observe there is a correlation between beta, resp. gamma, oscillations occurrence and a weak, resp. strong, theta oscillation.

Gamma oscillations are strongly driven by peripheral input



Gamma oscillation dependence on peripheral and centrifugal inputs

In this experiments, rats where tracheotomized and the nasal air flow was shifted from the animal respiratory rhythm by 0, 1/4, 1/2 or 3/4 cycle. Hence, any centrifugal input to the OB not driven by nasal air flow is shifted by the same amount. Left, resp. right, graph represents gamma episodes relative to nasal, resp. tracheal, air flow cycles.

We observe that gamma oscillations (frequency, energy, duration, theta phase) are independent of phase shifts and are thus fully driven by nasal air flow.

Conclusion

- Fast beta and gamma rhythms involve different neuronal populations:
  * gamma involves higher part of the EPL and may thus acts more locally with external tufted cells
  * beta involves lower part of the EPL and more granule cells which may indicate the implication of a larger network compared to gamma oscillation

- Fast oscillation occurence depends on the slow modulation amplitude which probably induces a different balance of excitation-inhibition in the OB

- Gamma oscillations seems to be independent of centrifugal inputs

Bibliography:
[1] Mitzdorf, (1985) *Physiol Rev,* **65**,37-100
[2].Rall and Shepherd (1968) *J Neurophysiol,* **31**,884-915
[3] Roux *et al* (2007) *J Neurosci Methods*, **160**, 135-43
[4] Neville and Haberly (2003) *J Neurophysiol*, **90**,3921-30

Proceedings NeuroComp(2011)

Stable frequency response to varying stimulus intensity in a model of the rat olfactory bulb.

Thomas Voegtlin, Corinne Amat, Virginie Briffaud, Nathalie Buonviso, **Emmanuelle Courtiol**, Nicolas Fourcaud-Trocmé.

In the rat olfactory bulb (OB), fast oscillations of the local field potential (LFP) are observed during the respiratory cycle. Gamma-range oscillations (60Hz) occurat the end of inspiration, followed by beta-range oscillations (15-20Hz) during exhalation. These oscillations are highly stereotyped, and their frequencies are stable under various conditions. Here we investigate the effect of stimulus intensity on activity in the OB. Using a double canulation protocol, we show that, although the frequency of the LFP oscillation does depend on the respiratory cycle, it is relatively independent from the intensity of odorant stimulation. In contrast, we found that the individual firing rate of mitral OB cells changes greatly with the intensity of the stimulation. Using a computer model of the OB, where fast oscillations are generated by the interplay between excitatory mitral/tufted cells, and inhibitory granule cells, we found that the difference between individual and population responses can be explained by the role of sub-threshold oscillations in the MCs. Sub-threshold oscillations of the MCs stabilize the frequency of the population oscillation, and allow their firing rate to vary without affecting the population frequency.

STABLE FREQUENCY RESPONSE TO VARYING STIMULUS INTENSITY IN A MODEL OF THE RAT OLFACTORY BULB

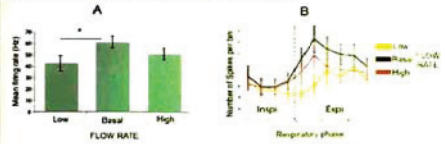
Thomas Voegtlin (1), Corinne Amat (2), Virginie Briffaud (2), Nathalie Buonviso (2), Emmanuelle Courtiol (2), Nicolas Fourcaud-Trocmé (2)
(1) Equipe Cortex, INRIA Lorraine; Campus Scientifique, B.P. 239 Vandoeuvre-les-Nancy, France
(2) Equipe Neurosciences, Systèmes sensoriels, comportement, cognition. CNRS UMR 5020, Lyon, France
voegtlin@loria.fr, camat@olfac.univ-lyon1.fr, vbriffaud@olfac.univ-lyon1.fr,
buonviso@olfac.univ-lyon1.fr, ecourtiol@olfac.univ-lyon1.fr, nfourcau@olfac.univ-lyon1.fr

Introduction

- The LFP in the olfactory bulb (OB) shows highly stereotyped oscillations during the respiratory cycle.
- Gamma-range oscillations (60Hz) occur at the end of inspiration, followed by beta-range oscillations (15-20Hz) during exhalation.
- Although the frequency of the oscillation does depend on the respiratory cycle, it is relatively independent from the intensity of odorant stimulation.
- Here we investigate the relation between stimulus intensity and the frequency of the oscillation, using both electrophysiological recordings and computer simulations.

Double canulation protocol

We recorded the LFP and the activities of mitral cells (MC) in urethane anesthetized animals, while varying stimulation intensity (air flow). For this, we used a double canulation protocol, where breathing is decoupled from odorant stimulation.

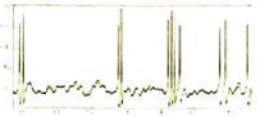


We found that the frequency of LFP does not depend on stimulus intensity, for both beta and gamma episodes.

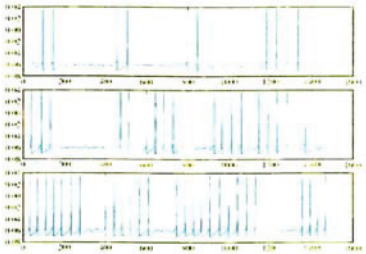
In contrast, the individual firing rate of OB mitral cells changes greatly with the stimulus; the number of spikes increases with the intensity of stimulation.

The importance of subthreshold oscillations

Electrophysiology recording show that mitral cells exhibit subthreshold oscillations.



Mitral cells were modeled after (Bathellier et al, 2006). The subthreshold oscillation is caused by the interaction between Na_p and K_s currents



When the intensity of stimulation is increased, the firing rate of the cell increases, while the frequency of this oscillation is almost unchanged (Bathellier et al., 2006).

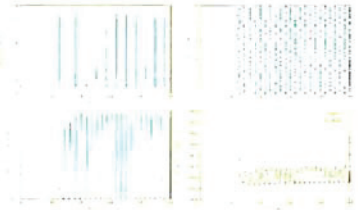
Hypothesis

The observed difference between individual and population responses can be explained by the role of sub-threshold oscillations in the MCs.

Sub-threshold oscillations of the MCs could stabilize the frequency of the population oscillation, and allow their firing rate to vary without affecting the population frequency.

Modeling the OB using graded inhibition

Fast oscillations are generated by the interplay between excitatory mitral/tufted cells (MCs), and inhibitory granule cells (GCs).



Graded inhibition allows the neurons to synchronize their activities even in the absence of spikes (Brea et al., 2009). In this regime, the frequency of the population oscillation matches the intrinsic frequency of the subthreshold oscillation .

Result : oscillation frequency is stabilized



- The firing rate increases (≈ linearly) with the intensity of the stimulation.
- The oscillation frequency is stabilized in the beta range; it increases linearly with the stimulation in the gamma range.

Conclusions

- Subthreshold oscillations of the MCs stabilize the frequency of the population oscillation, and allow the firing rate of MCs to vary without affecting the population frequency.
- Graded inhibition at the dendrodendritic synapse seems to be necessary in order to synchronize subthreshold oscillations.
- Thus, the interplay between STOs in the MCs and graded inhibition from the GCs could explain the difference between individual and population responses in the OB.

References.

- N. Buonviso, C. Amat, P. Litaudon, S. Roux, JP Royet , V Farget and G. Sicard , Eur. J. Neurosci. 17, 1811-1819, 2003
- W. Rall and GM Shepherd. Theoretical reconstruction of field potentials and dendrodendritic synaptic interactions in olfactory bulb. J Neurophysiol. 31(6):884-915, 1968
- K.R. Neville, L.B. Haberly. Beta and gamma oscillations in the olfactory system of the urethane-anesthetized rat. J Neurophysiol. 90(6):3921-30, 2003
- C. Martin, R. Gervais, B Messaoudi, N Ravel Learning-induced oscillatory activities correlated to odour recognition: a network activity. Eur J Neurosci. 23(7):1801-10, 2006
- J.N. Brea, L. M. Kay, N. J. Kopell : Biophysical model for gamma rhythms in the olfactory bulb via subthreshold oscillations, PNAS, 106(51), 2009, 21954-9.
- B. Bathellier, S. Lagier, P. Faure, PM. Lledo. Circuit Properties Generating Gamma Oscillations in a Network Model of the Olfactory Bulb, J. Neurophysiol 95, 2678-2691, 2006
- U.S. Bhalla, J.M. Bower. Exploring parameter space in detailed single neuron models: simulations of the mitral and granule cells of the olfactory bulb. J Neurophysiol 69(6):1948-65, 1993

Acknowledgements: This work was supported by the PIR-Neuroinformatique programme of the CNRS. Computer simulations were performed using the Brian simulator (http://www.briansimulator.org).

Society of French Neuroscience (2011)

How nasal airflow shapes spatio-temporal representation of odors at the olfactory bulb level: an optical imaging study

Philippe Litaudon, **Emmanuelle Courtiol,** Marc Thevenet, Belkacem Messaoudi, Samuel Garcia, Nathalie Buonviso, Frederic Esclassan

Olfactory sense and respiration are intimately related: odorant molecules reach receptor cells in the olfactory epithelium in a periodic way with inspiration and several studies have demonstrated that olfactory bulb (OB) activity is largely shaped by respiration. It should be keep in mind that anesthetized rat breaths slowly and very regularly whereas behaving rat adapts its sniffing behavior (amplitude, frequency) according to numerous parameters (odor, task, experience). Recent Ca^{2+} imaging studies has evidenced that nasal airflow parameters could modulated the spatio-temporal representation of the incoming message from neuroreceptors at the glomerular layer level. The aim of our study was to analyze how nasal airflow shapes the spatio-temporal distribution of odor evoked activity in the rat OB using voltage-sensitive dye imaging (VSDI). VSD signals originate mainly from post-synaptic activity and thus can measure odor-evoked activation of bulbar circuitry. Thus, compared to previous studies based on presynaptic activity measurements, VSD signals take into account the modulation of incoming activity by local interneurons. Experiments were performed on urethane anesthetized rats. The OB was stained with voltage-sensitive dye RH 1838 and image series of the dorsal OB were acquired with a CCD camera at 160 Hz. We used a double canulation protocol in order to make nasal airflow sampling independent from animal respiration. Thanks to this technique, we were able to test different parameters of the nasal airflow as the frequency (from 1 Hz to 10 Hz) or the strength of inhalation flow. Optical signals appeared as increase in fluorescence during odor presentation superimposed with a phasic component appearing after each inspiration. For a given flow rate, signal amplitude remained stable across frequency. Glomerular responses remained locked to the nasal respiration cycle even at high frequency sniffing and the magnitude of this modulation depended on the inspiration strength. Moreover, respiratory modulation is not homogeneous across all activated glomeruli. These results confirm that intranasal air dynamics also plays a critical role in shaping odor representation at the bulbar circuitry level.
This work was supported by an ANR grant (#ANR-07-NEURO-030).

How nasal airflow shapes spatio-temporal representation of odors at the olfactory bulb level

Philippe Litaudon, Emmanuelle Courtiol, Marc Thévenet, Belkacem Messaoudi, Samuel Garcia, Nathalie Buonviso, Frédéric Esclassan

Centre de Recherche en Neurosciences de Lyon, Equipe «Olfaction: du codage à la mémoire», Université-lyon 1, CNRS UMR 5292, INSERM U 1028, Lyon, France

Introduction

One of the key features of the mammal olfactory perception is that sensory input is intimately related to respiration. Indeed, the respiration cycle itself provides the mechanism for sampling odor stimuli. Thus, as far back as the very first electrophysiological works, the powerful influence of breathing was noticed in the olfactory system activity (*for a review, see Buonviso et al., Chem. Senses, 2006, 31: 145–154*).

Different authors have considered respiratory dynamic not only as the simple vector for odor molecules but also as an integral part of the olfactory percept.These assumptions are supported by behavioral data showing that rats adapt their sniffing strategy, both in frequency and flow rate, when performing odor discrimination or detection tasks (Youngentob et al., 1987, Physiol. Behav., 41:59-69). Other studies also suggest that the olfactory sampling-related rhythm could be a key mechanism of information transmission between olfactory, limbic and cerebellar structures.

Therefore, the question of how these sampling variations affect olfactory system activities is a subject of growing interest.

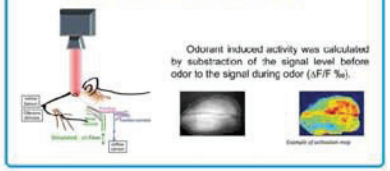
AIM OF THE STUDY :

Characterize concomitant effect of both sniffing frequency and flow rate on olfactory bulb postsynaptic activity at:

- the input (glomerular) level using voltage-sensitive dye imaging (VSDi)
- the intrinsic local network level using local field potentials (LFP) recordings.

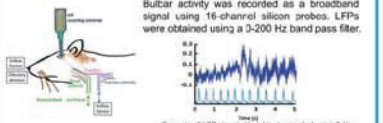
Material and methods

Voltage-Sensitive Dye Imaging



Odorant induced activity was calculated by substraction of the signal level before odor to the signal during odor ($\Delta F/F$ ‰).

Electrophysiological Recording

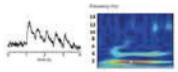


Bulbar activity was recorded as a broadband signal using 16-channel silicon probes. LFPs were obtained using a 0-200 Hz band pass filter.

Example of LFP signal (dark blue) recorded using 2 Hz simulated sniffing (light blue)

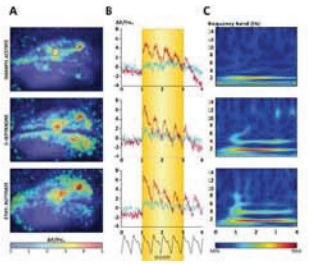
Common Features

- To uncouple the nasal airflow from animal respiration, we used a double cannulation and simulated nasal airflow protocol on urethan anesthetized rats.
- The nasal cannula was connected to a respiratory cycle simulator in order to control nasal airflow parameters.
- Simulated nasal respiratory cycles were imposed at: Frequency: 0 Hz (Constant inspiration), 1 Hz, 2 Hz, 4Hz, 6Hz or 10 Hz. Flow rate: 250, 500 and 1000 ml/min
- Odors: Isoamyl acetate (ISO) and 2-heptanone (HEP) and Ethylbutyrate (BUT).
- Respiratory dynamic of both optical signals and LFPs were analyzed using time frequency representation based on Morlet wavelet transform
- Amplitude of sniffing modulation was defined as the maximum power in the frequency band of interest



Example of time frequency representation (right) computed from an optical signal evoked by 2 Hz sniffing (left). (*) maximum power at 2 Hz defining the amplitude of sniffing modulation

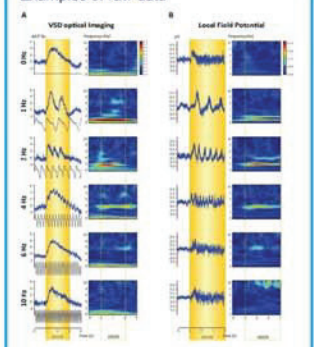
Odor maps at 2 Hz



- Odors evoked specific patterns of post-synaptic activity in the dorsal OB (A).
- Glomerular responses displayed a tonic component superimposed with a phasic component phased-locked with the imposed respiratory temporal pattern (B) as confirmed by time-frequency analysis (C).

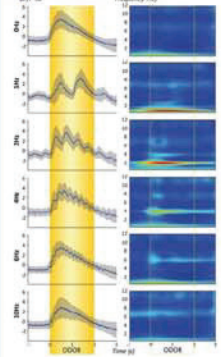
Impact of sniffing frequency

Examples of raw data



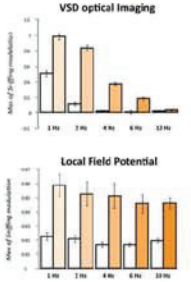
- Sniffing modulation of raw glomerular responses was observed at frequency up to 6 Hz.
- At 10 Hz, the phasic component related to sniffing modulation seemed to disappear on optical responses but was still observable on LFP

Mean VSDi responses



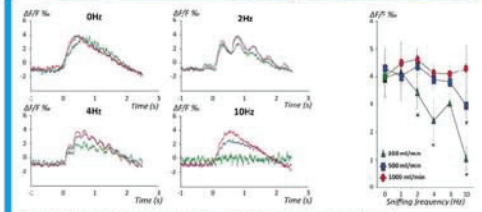
- Sniffing modulation was clearly distinguishable on mean signal at sniffing frequency up to 6 Hz and disappeared at 10 Hz.
- The tonic component was unaffected by imposed sniffing frequency

Amplitude of sniffing modulation



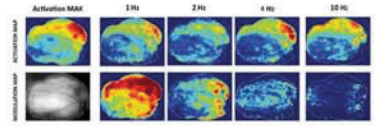
The amplitude of the sniffing related modulation induced by each imposed sniffing frequency (orange) was larger than the corresponding frequency content of the tonic response evoked by a continuous aspiration (white).

Concomitant effect of frequency and flow rate



- Flow rate has little impact on optical response at resting frequency sniffing (2 Hz)
- Variation of flow rate seemed to impact the response at high sniffing frequency.
- Sniffing frequency had no effect on signal amplitude at high flow rate (1000 ml/min). Conversely for moderate (500 ml/min) and low (250 ml/min) flow rate, increasing sniffing frequency induced a decrease in signal amplitude.

Spatial distribution of sniffing modulation



Maximum power in each frequency band of interest was computed from a pixel by pixel time-frequency analysis. Sniffing modulation map largely overlapped activation maps indicating that sniffing modulation is spatially concomitant of odor response.

Conclusion

Overall, our data demonstrate that postsynaptic activity at the glomerular level (VSDi) and in the intrinsic bulbar network (LFP) is modulated by both sniffing flow rate and frequency. These two parameters jointly affect the level of activity induced by an olfactory stimulus, so that the reduction of the activity level induced by a frequency increase is compensated by flow rate increase. Moreover we demonstrated that if the frequency impact on the postsynaptic glomerular activity dynamic is strongly reduced with increasing frequency, high sniffing frequency (10 Hz) continues to shape OB network activity as shown by LFP recordings.

Brought together, these results suggest that concomitant increase in sniffing frequency and flow rate could improve the capacity to detect fine variations of olfactory environment while preserving the supposed role of sniffing modulation on inter cerebral areas communication.



This work was supported by an ANR grant (#ANR-07-NEURO-036)

Champalimaud Neuroscience Symposium (2011)

Ce poster a également été présenté à :

Society of French Neuroscience (2011) & Hertie Winter School (2012)

Why sniff strong when sniff fast : deciphering the effects of frequency and flow rate variation on olfactory bulb activity.

Emmanuelle Courtiol, Frederic Esclassan, Nicolas Fourcaud-Trocmé, Samuel Garcia, Philippe Litaudon, Nathalie Buonviso.

Olfactory sampling behaviour (namely sniffing) seems to be a part of the olfactory percept. First, olfactory bulb (OB) activity is known to be highly related with respiration. Second, olfacto-motor activity or sniffing is highly variable (Youngentob, 1987). Nevertheless, impact of sniffing variations on OB activity, and particularly at Mitral/Tufted(M/T) cells and local field potential (LFP) levels, was poorly studied. In a first study (Courtiol et al., 2011), we showed that nasal flow rate had a strong effect on M/T cell activity, LFP gamma and beta oscillations, and on the synchronization between spikes and LFP oscillations. In the present study, our aim was to understand the effect of sniff frequency variation alone and combined to flow rate variation on OB activity. For this purpose, we used an anesthetized model of double-canulation tracheotomized rats allowing a fine control of nasal airflow dynamics. Both LFP and M/T cell responses to odors were recorded. Our results highlight a tradeoff effect between frequency and flow rate on OB odor response.
This work was supported by a grant from "Agence Nationale de la Recherche" (#ANR-07-NEURO-030).

Why sniff strong when sniff fast : deciphering the effects of frequency and flow rate variation on olfactory bulb activity

Courtiol E., Esclassan F., Fourcaud-Trocmé N., Garcia S., Litaudon P., Buonviso N.

Centre de Recherche en Neuroscience de Lyon Equipe Olfaction et Mémoire INSERM U1028 - CNRS UMR5292 Université Claude Bernard Lyon 1

INTRODUCTION

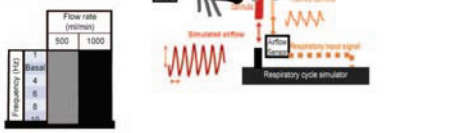
Odorant molecules are captured by sniffing. Sniffing constrains both the temporality and intensity of the input to olfactory structures. Sniff has been shown to be highly variable at least in frequency and flow rate. We have shown that sampling flow rate variation could impact olfactory bulb (OB) activities (Courtiol et al., 2011). Numerous studies have focused on the impact of sampling frequency on olfactory epithelium activity but little is know about the effect of sampling frequency on OB activity. Studies only focused on unitary activity and none of them has looking for the joint effects of sniffing frequency and flow rate.

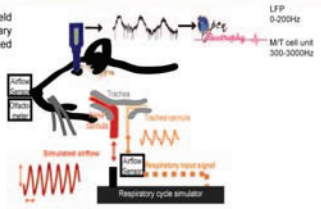
Our aim was twofold. First we wanted to test the impact of sampling frequency at different level of OB activity : does high sampling frequency modify the strength and/or the latency of bulbar response? Second, can a higher flow rate counterbalance the effects of high sniffing frequency ?

MATERIAL AND METHODS

Electrophysiological recordings of local field potential and mitral/tufted (M/T) cell unitary extracellular activity on urethane anesthetized animals.

OB activities in response to odors were recorded under different sampling conditions :

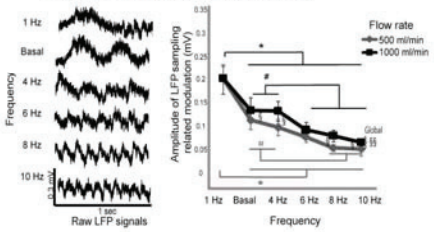




RESULTS

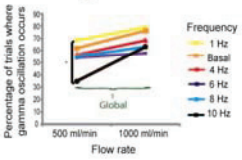
Persistence of OB sampling-related rhythmicity : tradeoff between sampling frequency and flow rate

LFP sampling-related modulation



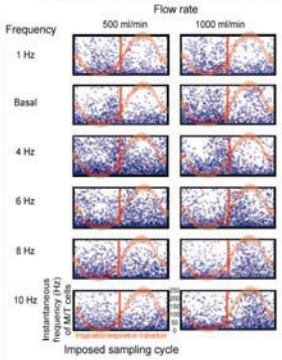
LFP sampling-related modulation still persists but is reduced at high sampling frequency. This decrease of amplitude is countebalanced by a flow rate increase.

LFP gamma oscillations



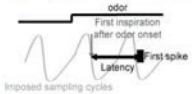
Gamma oscillations still appear at high sampling frequency even if their occurence sightly decreases. At the opposite, a high flow rate improves gamma oscillations occurence.

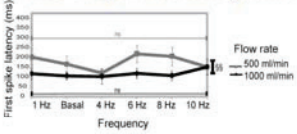
M/T cells sampling-related activity



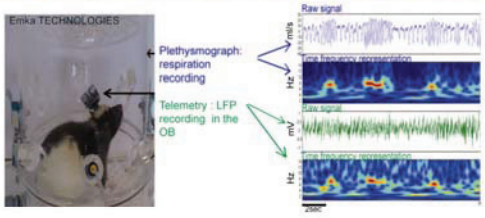
Sampling-related activity of M/T cells persists but is decreased at high sampling frequency. High flow rate compensates this effect by increasing percentage of M/T cells sampling-related activity. Increase sampling frequency leads to a progressive shift of M/T cell discharge relative to the respiratory cycle.

A higher sampling frequency does not decrease M/T cells response latency whereas a higher flow rate does

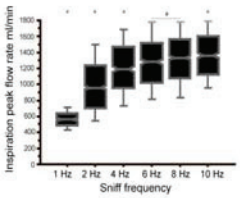




Awake experimental preparation : persistence of LFP sampling related modulation and sniffing strategy



To verify that the persistence of LFP sampling- related modulation is not an anesthesia effect, OB LFP (telemetry) and sniffing activity (plethysmography) are recorded concomitantly in awake rats. Sampling-related modulation is still present in the LFP signal whatever the animal's sampling frequency.



Using awake rats, we showed that a co-variation between frequency and flow rate, which is necessary for the tradeoff we observed in the anesthetized preparation, occured in the behaving animal. As sniff frequency increases, flow rate (expiration and inspiration) increases.

CONCLUSION

We demonstrate that a tradeoff between sampling frequency and flow rate results in the persistence of sampling-related activities in the OB which could be a basis for communication between brain areas in the theta band. We also demonstrate that only flow rate increase could induce an earlier M/T cells response which is compatible with psychophysical times limit.

Effects of sampling variations on OB activities in our anesthetized model are not an anesthesia effect. Our study shows that sampling frequency and flow rate can act either independently or synergistically on bulbar output activity to shape the neuronal message.

This work was supported by a grant from "Agence Nationale de la Recherche" (#ANR-07-NEURO-030).

GDR multielectrode (2011)

Temporal relationship between sniffing frequency, olfactory bulb respiration-related activity and hippocampus thêta waves.

Emmanuelle Courtiol, Nicolas Fourcaud-Trocmé, Nathalie Buonviso.

Since odorant molecules sampling is dependent on inspiratory act, sniffing constrains both the timing and the intensity of the input to the olfactory structures. Sniffing has been shown to be highly variable at least in frequency.

We previously showed that sampling frequency impacts the activity of the first brain relay (i.e. the olfactory bulb). Sampling frequency seems to be also an important parameter for the brain area communication. Indeed, different authors have shown a specific coherence between the activities of olfactory bulb and hippocampus during sniffing. We want to test the hypothesis that when sampling frequency is in the same frequency range than hippocampal thêta rhythm, bulbar response to odors is improved.

To test this idea, we performed a double tracheotomy in urethane anesthetized rats. This allows us to impose a specific sampling frequency through the nasal cavity. In parallel, we recorded simultaneously both olfactory bulb and hippocampus LFP activity. Recordings are in progress.

Temporal relationship between sniffing frequency, olfactory bulb respiration-related activity and hippocampus activity

Courtiol E.,Fourcaud-Trocmé N.,Buonviso N.

Centre de Recherche en Neuroscience de Lyon Equipe Olfaction et Mémoire INSERM U1028 - CNRS UMR5292 Université Claude Bernard Lyon 1

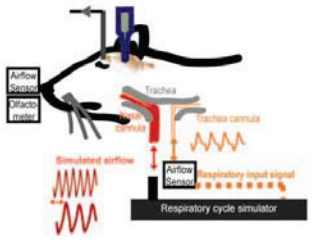
INTRODUCTION

Since odorant molecules sampling is dependent on inspiratory act, sniffing constrains both the timing and the intensity of sensory input to the olfactory structures. Sniffing has been shown to be highly variable at least in frequency (Youngentob et al., 1987). We previously showed that sniffing frequency variation impacts the activity of the first olfactory brain relay (i.e. the olfactory bulb (OB), Courtiol et al., 2011). Particularly, OB local field potentials (LFP) can follow high sniffing frequency (up to 10 Hz). Probably due to closeness in frequency, sniffing-related modulation of the OB can interact with hippocampal theta rhythm. Indeed, different authors have shown 1) specific phase relation between sniffing and hippocampus theta wave (Macrides et al., 1982) and 2) a specific coherence between activities of the OB and the hippocampus during sniffing (Kay, 2005).

In this study, we were interested in characterizing these bulbo-hippocampal relations. Specifically, we asked if sensory input could have differential effect onto the limbic system according to the sampling (sniffing) frequency. To answer this question, we needed an anesthetized model in which sniffing frequency could be precisely controlled and uncoupled from animal own respiration. We then performed a double-tracheotomy in urethane anesthetized rats. This paradigm allowed us to impose a specific sniffing frequency through the nasal cavity. In parallel, OB and hippocampus LFP activity were simultaneously recorded.

MATERIAL AND METHODS

Electrophysiological recordings of LFP were performed on urethane anesthetized animals. Both OB and hippocampal LFP were recorded simultaneously under different sniffing frequency conditions (2Hz, 4Hz, 6Hz and 8Hz).



Under urethane anesthesia, hippocampus activity shifts from slow oscillation mode to theta mode as already described by Clément et al. (2008).





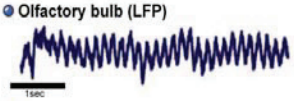
Using 16-channel silicon probes, we were able to record different parts of the hippocampus



PRELIMINARY RESULTS

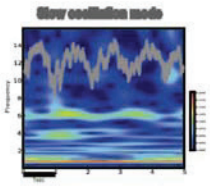
Sniffing-related modulation is represented in the hippocampal signal

- Olfactory bulb (LFP)

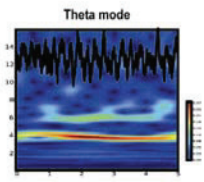


- Imposed sniffing





- Hippocampus (LFP)



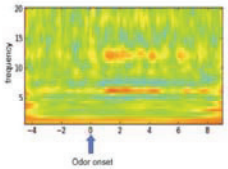
We observed that : - a sniffing modulation is present in the hippocampal signals and could be observed whatever the imposed sniffing frequency
- sniffing modulation could be observed in both theta and slow oscillation states.

Stable bulbo-hippocampal coherence in the sniffing frequency bands

- Wavelet-Coherence

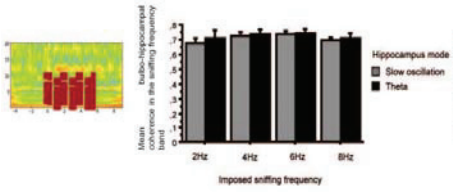
To measure the bulbo-hippocampal relationship, we used coherence analysis. To have an access to the time aspect of coherence, we used the wavelet-coherence method developed by JP Lachaux (2002). We first measured the coherence in each of the sniffing frequency band used.

- Odor increases bulbo-hippocampal coherence in the sniffing frequency band



Example of a coherence map between bulbar and hippocampal signals. Sniffing frequency was imposed at 6Hz.

- Bulbo-hippocampal coherence in the sniffing frequency bands



Based on our preliminary results, it seems that bulbo-hippocampal coherence at sniffing frequency 1) is not higher at specific sniffing frequencies and 2) is not affected by the hippocampal state.

CONCLUSION and PERSPECTIVES

We showed that a sniffing-related modulation existed in the hippocampal signal 1) whatever the sniffing frequency and 2) whatever the hippocampal state. Then, the hippocampus is aware of the sampling strategy whatever its own state. We showed that bulbo-hippocampal coherence increased at odor onset, specifically in the sniffing frequency band. During odorant stimulation, we did not observe a significant effect of sniffing frequency or hippocampal state on the bulbo-hippocampal coherence. These are our preliminary results and it remains to determine 1) if the phase relation between bulbar and hippocampal signals could be modified by sniffing frequency 2) how theta oscillations are affected by sniffing frequency. Analyses are in progress.

This work was supported by a grant from "Agence Nationale de la Recherche" (#ANR-07-NEURO-030).

Achems (2012)

Could sniffing variations improve olfactory perception?

Emmanuelle Courtiol, Belkacem Messaoudi, Samuel Garcia, Marc Thévenet, Nathalie Buonviso.

Different authors have considered sniffing not only as the odorant molecules vector but also as an integral part of the olfactory percept (Mainland and Sobel, 2006). While sniffing has been shown to be highly dynamic (Youngentob et al., 1987), the precise role of its variations in frequency and flow rate in olfactory perception remains the question to be answered. As first suggested by Schoenfeld and Cleland (2005), variations would improve olfactory capabilities by optimizing the deposition of odor molecules through the olfactory epithelium (OE). To test this hypothesis, we needed to record sniffing variations, using non-invasive method to not disturb sniffing. For this purpose, we adapted the double discrimination task developed by Uchida and Mainen(2003) in a whole-body plethysmograph. Here, we present our preliminary results. They suggest that 1) specific sniffing variations help in olfactory perception and 2) sniffing parameters vary as a function of odorant chemical properties. If our first results are confirmed, this would place sniffing as a specific motor act similar to how eye movements serve to allow acute visual perception.

Could sniffing variations improve olfactory perception?

Courtiol E., Messaoudi B., Garcia S., Thévenet M., Buonviso N.

Centre de Recherche en Neuroscience de Lyon, Equipe Olfaction: du codage à la mémoire, INSERM U1028 - CNRS UMR5292 Université Claude Bernard Lyon 1

Introduction

Different authors have considered sniffing not only as the odorant molecules vector but also as an integral part of the olfactory percept (Mainland and Sobel, 2006). First, sniffing constrains both the temporality and intensity of the input to the olfactory structures. Second, Youngentob et al., (1987) have shown that sniffing is highly dynamic. Nevertheless, the precise role of sniffing variations in olfactory perception remains the question to be answered. More precisely: do animals adjust their sniffing relative to odorant quantity and quality to improve olfactory perception? In terms of quantity, it has been shown that sniffing flow rate was odorant concentration-dependent, in both humans (Johnson et al., 2003) and rats (Youngentob et al., 1987). In terms of odorant quality (odorant physicochemical properties), Schoenfeld and Cleland (2005) have suggested that sniffing variations would serve to optimize the deposition of odor molecules through the olfactory epithelium. Our aim herein was to test this hypothesis. For this purpose, we needed to record sniffing variations in freely moving animals, using a non-invasive method to disturb sniffing as less as possible. We adapted the two-alternative discrimination task developed by Uchida and Mainen(2003) in a whole-body plethysmograph.

General objective

Could sniffing variations improve olfactory perception and be considered as a specific sensory-motor act, similar to how eye movements serve to allow acute visual perception?

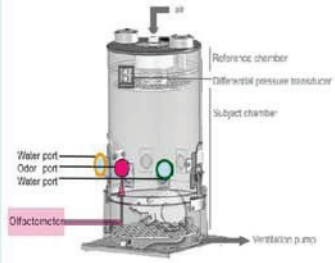
Specific question

Could an animal adjust its sniffing relative to odorant physicochemical properties?

Material and Methods

Sniffing recording in freely moving rats

- Whole-body plethysmograph: a non-invasive method to investigate sniffing strategies



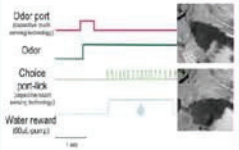
Behavioral task

- A two-alternative choice odor discrimination task



Odorants with different physicochemical properties were used:Carvone (car); Isoamyl acetate (iso); Methyl benzoate (mbz); Limonene (lim).

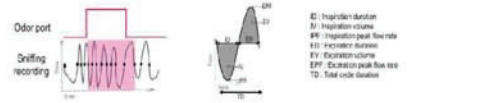
- Experimental protocol



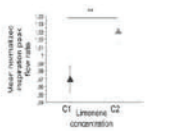
Analysis and validation

- Analysis

Sessions with >75 % accuracy for each port were used. Each session was composed of ~100 trials. Then, respiratory cycles occuring during each odor port period were selected and analyzed. Each feature of the respiratory cycle was extracted.



- Validation of our setup
  - A decrease of odorant concentration increases inspiration peak flow rate



As demonstrated by others (Youngentob et al., 1987), a decrease of odorant concentration leads to an inspiration peak flow rate increase. Thus, our experimental setup allows 1) to accurately measure sniffing and 2) to reproduce data obtained by others.

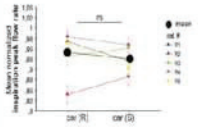
C1 and C2 correspond to air phase dilutions : 2.10^{-2} and 1.10^{-1} of vapor pressure, respectively.

Preliminary Results

Five rats were used for the analysis using different odor pairs. Data were analysed using sessions with > 75 % accuracy. A factorial ANOVA was used.

Sniffing is not adjusted when similar odors are used

We used a similar odor pair : car (S) and car (R).
We did not observe substantial changes of sampling duration (odor port) between both odors.



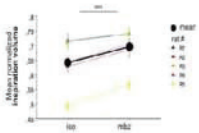
There is no significant variation of the inspiration duration between similar odors. No significant effect was observed neither on the inspiration amplitude, volume nor on expiration parameters.

Rats do not seem to use a specific strategy when two closely related odorants were used.

Sniffing is adjusted when dissimilar odors are presented

- Various sniffing parameters are influenced by odor quality

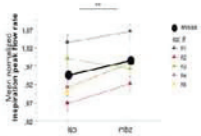
We used a dissimilar odor pair : iso and mbz.
We did not observe significant changes of sampling duration (odor port) between both odors.

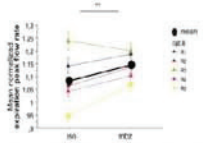


We observed a significant variation of inspiration volume depending on odorant quality. This change was consistent across the 5 rats. This increase was explained by both an increase in inspiration peak flow rate and duration.

Because sniffing could not be reduced to only one parameter, we also tested the effect of odor quality on expiration parameters.

Expiration peak flow rate is adjusted by odor identity. We also observed a significant effect of odor identity on both expiration volume and duration.

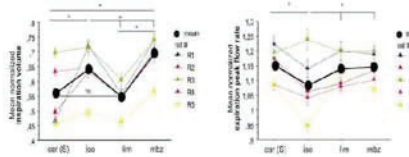




Rats adapt their sniffing when they have to discriminate dissimilar odors. Odor identity not only affects one but all sniffing parameters.

Iso and mbz present numerous differences in terms of physicochemical properties (molecular weight, vapor pressure, ...).
To gain insight into which physicochemical parameters have a strong impact on sniffing, we used others odors in combinations.

- Relation between sniffing variations and odorant physicochemical properties



Inspiration volume is significantly adjustec by odor quality. This effect was due to both inspiration duration and peak flow rate variations. Concerning expiration peak flow rate, the effect was less important with only iso being significantly different from other odors. The differential effect of odorants on sniffing parameters raises a question : could the variations in different sniffing parameters follow variations in different odorant physicochemical properties? For exemple, inspiration volume could be more related to odorant solubility (Hansen solubility parameter) and expiration peak flow rate to the molecular weight or to 1/vapor pressure.



To conclude about the relation between sniffing parameters and odorant physicochemical properties, we will need to use larger panel of odor pairs.

Conclusion

Based on our preliminary results, it seems that sniffing variations are related to odorant physicochemical properties. This important result needs to be strengthened by using additionnal animals, extended by using a larger panel of odorants and refined by looking at individual respiratory cycles during the time course of the odor sampling time. We will also compare sniffing parameters between false and exact behavioral responses to determine whether sniffing variations are related to performances. If our first results are confirmed, this would place sniffing as a specific motor act, namely, the olfacto-motor act. In the future, studies will be necessary to understand how and which structures are involved in this specific motor act.

This work was supported by ANR grant (ANR-07-NEURO-030)