



HAL
open science

Contribution à l'étude de la transduction et du codage des informations olfactives. Etude électrophysiologique des variations du métabolisme minéral en réponse à la sollicitation du système olfactif.

Abdelmajid Khayari

► **To cite this version:**

Abdelmajid Khayari. Contribution à l'étude de la transduction et du codage des informations olfactives. Etude électrophysiologique des variations du métabolisme minéral en réponse à la sollicitation du système olfactif.. Biologie animale. Université Henri Poincaré - Nancy 1, 1990. Français. NNT : 1990NAN10033 . tel-01748588

HAL Id: tel-01748588

<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01748588>

Submitted on 29 Mar 2018

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

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



AVERTISSEMENT

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

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

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

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

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

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

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



THESE D'UNIVERSITE

présentée devant

L'UNIVERSITE DE NANCY - I

pour obtenir le titre de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE NANCY - I

Spécialité : NEUROSCIENCES
Option : ELECTROPHYSIOLOGIE

par

Abdelmajid KHAYARI

**CONTRIBUTION A L'ETUDE DE
LA TRANSDUCTION ET DU CODAGE
DES INFORMATIONS OLFACTIVES**
*Etude électrophysiologique des variations
du métabolisme minéral en réponse à
la sollicitation du système olfactif*

Thèse soutenue publiquement le 21 Mars 1990 devant la commission d'examen :

Président : M. J.L. DAVRAINVILLE

Rapporteurs : MM. A. HOLLEY

P. FELTZ

Examineurs : MM. B. KRAFFT

F. MATH

J. ATKINSON

Professeur (NANCY - I)

Professeur (NANCY - I) LYON - I

Professeur (STRASBOURG - I)

Professeur (NANCY - I)

Maître de conférences (NANCY - I)

Professeur (NANCY - I)

*A mes parents,
mes frères,
mes soeurs
et mes amis.*

ABREVIATIONS UTILISEES DANS LE TEXTE:

aCa: activité calcique extracellulaire
aCa₀ : activité calcique extracellulaire de repos
aK: activité potassique extracellulaire
aK₀: activité potassique extracellulaire de repos
ΔaCa: variation de aCa
ΔaK: variation de aK
BO: bulbe olfactif
Ca-MIS: électrode calcium-sensitive
DA: dopamine
EOG; électroolfactogramme
K-MIS: électrode potassium-sensitive
mM: millimole
NA: nor-adrénaline
nA: nanoampère
NO: nerf olfactif
NRC: neurorécepteur
pA: picoampère
PAD: dépolarisation des afférences primaires
pl: picolitre
PN: postnatal
PPSE: potentiel postsynaptique exciteur
PPSI: potentiel postsynaptique inhibiteur
S: stimulation
SNC: système nerveux central
SNP: période supranormale
TOL: tractus olfactif latéral
UI: unité internationale
5-HT: (5-hydroxytryptamine) sérotonine

REMERCIEMENTS

Ce travail a été réalisé au laboratoire de Physiologie Générale II, Faculté des sciences NANCY-I, dirigé par le Professeur J.L. DAVRAINVILLE.

Mes remerciements vont d'abord aux membres du jury:

A Monsieur le Professeur J.L. DAVRAINVILLE qui m'a accueilli dans son laboratoire en 1984, m'a accordé sa confiance et m'a conseillé tout au long de mon travail consacré par la soutenance de cette thèse dont il a accepté d'être le président de jury. Qu'il soit assuré de ma profonde reconnaissance et de ma considération.

Au Docteur F. MATH qui m'a tout appris sur la recherche et ses techniques et en qui j'ai trouvé un maître dont j'essayais d'être un bon élève. Je ne le remercierais jamais assez pour les longues discussions sans lesquelles ce travail n'aurait jamais progressé. Je lui adresse mes remerciements les plus sincères de m'avoir fait profiter de sa grande compétence et je formule ici le souhait de collaborer encore longtemps avec lui.

A Monsieur le Professeur A. HOLLEY qui m'a fait l'honneur de s'intéresser à mes travaux, de m'inviter dans son laboratoire de Physiologie Neurosensorielle de LYON et d'avoir accepté d'être le rapporteur de ce travail qui a beaucoup progressé grâce à ses judicieuses suggestions.

A Monsieur le Professeur P. FELTZ qui m'a accueilli plus d'une fois dans son laboratoire de Physiologie Générale à STRASBOURG où l'occasion m'a été donnée d'apprécier sa très grande compétence scientifique et ses qualités humaines. Qu'il soit remercié pour avoir accepté d'être le rapporteur du présent travail.

A Monsieur le Professeur B. KRAFFT qui m'a fait l'honneur d'accepter de participer au jury de cette thèse et qui m'a prodigué des conseils pertinents lors de nos nombreuses entrevues.

A Monsieur le Professeur J. ATKINSON de la faculté de Pharmacie de NANCY qui a bien voulu juger mon travail et participer au jury de cette thèse. Je l'en remercie très sincèrement.

Je tiens, ensuite, à remercier tous les membres du laboratoire MM COUSIN, VOGEL, Mmes MOREL, COGNET qui ont su créer une ambiance amicale propice au travail et à la production scientifique.

Enfin, j'exprime ma profonde gratitude à tous ceux qui ont participé avec leur amitié et leur présence au bon déroulement de ce travail, en particulier Françoise VANDENBUSSCHE qui a réalisé avec soin et dévouement la frappe et la mise en page de la quasi-totalité de ce mémoire.

Sens de la confusion donc des rencontres,
sens rare des singularités, l'odorat glisse
du savoir à la mémoire et de l'espace au
temps; sans doute, des choses aux êtres.

M. SERRES, Les cinq sens
Grasset, 1985

RESUME:

Basés sur l'enregistrement des fluctuations du métabolisme minéral dans le système olfactif, les résultats rapportés dans cette thèse traitent de l'implication fonctionnelle des flux ioniques dans la perception olfactive.

Après un rappel bibliographique des données anatomiques, électrochimiques et électrophysiologiques du système olfactif, nous détaillons nos résultats comme suit:

Dans la première partie, nous montrons que le phénomène de transduction dont le siège est la muqueuse nasale, s'accompagne d'importants changements des activités potassique et calcique extracellulaires. Nos résultats indiquent une implication directe des ions Ca dans la genèse de l'électroolfactogramme chez la grenouille.

Dans la deuxième partie, nous apportons une contribution originale à l'étude du codage bulbaire des informations olfactives en démontrant que l'accumulation extracellulaire de K est impliquée dans le processus de compression dynamique des signaux afférents au niveau des glomérules olfactifs du rat. La localisation intraglomérulaire de ce phénomène est étayée par d'autres données mettant en évidence l'absence de diffusion de K exogène et l'existence d'une importante concentration tissulaire de l'activité Na,K-ATPase au niveau glomérulaire. En outre, nous démontrons, à travers l'étude ontogénétique de la maturation de l'inhibition GABAergique, que les récepteurs portés par les terminaisons nerveuses glomérulaires sont de type GABA_B chez le rat nouveau-né.

Dans la discussion générale, nous interprétons nos résultats en nous basant sur les théories du codage qualitatif des odeurs et plus précisément sur la théorie des motifs spatio-temporels.

SUMMARY:

The results reported in this thesis were obtained by direct measurement of ion movements in the olfactory system using ion-selective microelectrodes. The investigations which were undertaken aimed to contribute to the studies on olfactory quality coding and to obtain additional insights on fluctuations in ionic metabolism underlying receptor depolarization and information processing in olfactory bulb glomeruli.

Two Vertebrate species were used as study models. While olfactory bulb was studied in the rat, epithelial ion movements were investigated in the frog inasmuch as this animal allowed easier experimental approach.

Utilizing the frog olfactory epithelium as a model structure, we first discovered that the stimulation-induced variations in extracellular K and Ca clearly show that Ca, unlike K, is directly involved in EOG generation.

In the rat olfactory bulb, we focused on the metabolic aspects of odor quality coding. Olfactory nerve stimulation was found to induce a two-step increase in extracellular K - and decrease in Ca- within single glomeruli which were accompanied by a substantial fall in mitral cell firing rate. Extracellular K accumulation was viewed as a main mechanism by which the attenuation of glomerular transmission might occur. Some other original findings such as the lack of lateral spread of K and the higher tissue concentration of Na,K-ATPase activity in the glomerular layer, support this proposal.

Finally, the exploration of the ontogenic maturation of GABAergic inhibition in the rat olfactory bulb, showed that the former undergoes profound changes during the perinatal period. The main finding was that the olfactory bulb entry is dominated at birth by bicuculline-resistant GABA_B receptors whereas typical GABA_A receptors appear later.

Our results are interpreted in relation with olfactory coding theories with special reference to attenuative processes occurring in olfactory glomeruli.

REFERENCES DES TRAVAUX ORIGINAUX PUBLIES:

KHAYARI, A.; MATH, F; & DAVRAINVILLE, J.L. (1988a)

Electrical stimulation of primary olfactory nerve induces two types of variations in the extracellular potassium activity within the glomerulus of the rat olfactory bulb in vivo.

Brain Res. 457 188-191

MATH, F; KHAYARI, A. & DAVRAINVILLE, J.L. (1988b)

Influence of GABA, baclofen and bicuculline on the extracellular K activity in the olfactory bulb of the developing rat.

Brain Res. 461 384-387

KHAYARI, A.; MATH, F; & DAVRAINVILLE, J.L. (1988c)

Evidence for an absence of K spread in the glomerular layer of the rat olfactory bulb.

Neurosci. Lett. 93 56-60

KHAYARI, A.; MESFIOUI, A.; MATH, F; & DAVRAINVILLE, J.L.

Na,K-ATPase in the rat olfactory bulb : evidence for a higher enzymatic activity in the glomerular layer.

Brain Res. 510 (1990) 140-143

KHAYARI, A.; MATH, F. & TROTIER, D. (1989b)

Odorant-evoked potassium activity changes in the frog olfactory epithelium.

Brain Res. (à paraître)

KHAYARI, A.; MATH, F. & TROTIER, D.

Odorant-evoked free calcium vs potassium variations in the frog olfactory epithelium.

Olfaction and Taste (soumis)

TABLES DES MATIERES

	Page
REMERCIEMENTS	3
RESUME	6
SUMMARY	7
REFERENCES DES TRAVAUX ORIGINAUX PUBLIES	8
TABLE DES MATIERES	9
<u>INTRODUCTION</u>	16
I- L'ETAGE RECEPTEUR.....	16
A- STRUCTURE.....	16
B- PROPRIETES ELECTROPHYSIOLOGIQUES... ..	18
II- LE BULBE OLFACTIF.....	20
A- ORGANISATIONS STRUCTURALE ET ULTRASTRUCTURALE.....	20
1- Niveau glomérulaire.....	20
a- Organisation des fibres afférentes dans le glomérule.....	20
b- Organisation synaptique.....	21
2- Couches profondes.....	23
a- Organisation anatomique.....	23
b- Organisation synaptique.....	24
B- INNERVATION DU BULBE.....	25
C- PROPRIETES FONCTIONNELLES.....	25
1- Données électrophysiologiques.....	26
a- Activité électrique.....	26
b- Aspects ioniques.....	27
2- Données biochimiques.....	28
a- Neurotransmetteurs.....	28
α - Acides aminés.....	28
β - Amines biogènes.....	29
γ - Peptides et protéines.....	29
b- Métabolisme électrolytique.....	30
III- BUT DU TRAVAIL.....	32

<u>MATERIELS ET METHODES</u>	34
I- CHOIX DES ANIMAUX.....	34
1- Etude de l'épithélium olfactif.....	34
2- Etude des bulbes olfactifs.....	34
II- METHODES EXPERIMENTALES.....	35
A- PREPARATION DES ANIMAUX.....	35
1- Abord de l'épithélium.....	35
2- Abord des bulbes olfactifs.....	35
B- METHODES ELECTROPHYSIOLOGIQUES.....	36
1- Microelectrode de verre.....	36
a- Micropipette simple.....	36
b- Micropipette d'iontophorèse.....	38
c- Microélectrodes ion-sensitives.....	39
α - Généralités.....	39
β - Fabrication.....	40
γ - Caractéristiques opérationnelles.....	45
2- Electrodes de stimulation.....	45
3- Implantation des électrodes.....	46
4- Appareillage.....	46
a- Stimulations	46
α - Olfactométrie.....	46
β - Stimulations électriques du nerf olfactif.....	48
b- Enregistrement.....	48
c- Iontophorèse.....	49
C- METHODES BIOCHIMIQUES.....	52
D- CONTROLES HISTOLOGIQUES.....	54
III- CALCULS ET TESTS STATISTIQUES.....	54

RESULTATS
ET DISCUSSION

56

1ère PARTIE

VARIATIONS DU METABOLISME MINERAL DANS L'EPITHELIUM OLFACTIF DE GRENOUILLE

56

I - RESULTATS	57
A- MOUVEMENTS POTASSIQUES.....	57
1- Dans le mucus.....	57
2- Dans l'assise épithéliale.....	59
3- Application de K exogène.....	62
4- Application d'ouabaïne.....	64
5- Application de cobalt.....	64
B- MOUVEMENTS CALCIQUES.....	66
1- Dans le mucus.....	66
2 Dans l'assise épithéliale.....	69
3 Influence des ions cobalt.....	69
4- Application de Ca ⁺⁺ exogène.....	72
C- COMPARAISON DES TRACES DES FLUX IONIQUES ET DE L'EOG.....	74
II- DISCUSSION	76
A- Flux potassiques associés à la formation de l'EOG.....	76
B- Flux calciques.....	79

2ème PARTIE

VARIATIONS DU METABOLISME MINERAL ET MATURATION DE L'INHIBITION GABA-ERGIQUE DANS LES GLOMERULES OLFRACTIFS DU RAT

83

I- INFLUENCE DE L'ACTIVATION DES AFFERENCES PRIMAIRES SUR LE METABOLISME MINERAL DANS LE BULBE OLFRACTIF DU RAT.

RESULTS	84
A- STIMULATIONS ELECTRIQUES DU NERF OLFRACTIF.....	84
1- Paramètres de stimulation.....	86
2- Seuil d'apparition du pic K.....	89
3 Localisation du pic K.....	89
4- Distribution du pic K dans la couche glomérulaire.....	89
5- Influence de la stimulation du N.O. sur l'activité électrique glomérulaire.....	92
B- STIMULATIONS MULTIPLES.....	95
C- INFLUENCE DE LA COMPOSITION ELECTROLYTIQUE DU MILIEU EXTRACELLULAIRE SUR LE PIC K.....	95
1- Influence des ions potassium.....	95
a- K seul, chargement du glomérule en K ⁺	95
b- Stimulation et application de K ⁺	98
2- Le pic K est-il un artéfact?.....	98
a- Dépression envahissante.....	99
b- Anoxie.....	99
c- Lésions tissulaires.....	99
3- Influence des ions calcium.....	100
4- Influence des ions cobalt.....	100
D- INFLUENCE DES NEUROTRANSMETTEURS.....	102
1- Effets du GABA et des GABA-mimétiques sur le pic K.....	102
a- GABA.....	102
b- Bicuculline.....	102
c- Baclofène.....	104

2- Effets de la dopamine et de l'halopéridol.....	105
a- Dopamine.....	105
b- Halopéridol.....	105
c- GABA + dopamine.....	105
3- Effets de la sérotonine.....	108
4- Effets de la carnosine.....	108
5- Effets de l'insuline.....	108
E- RELATIONS ENTRE LES VARIATIONS POTASSIQUES ET LES MOUVEMENTS CALCIQUES DANS LA COUCHE GLOMERULAIRE.....	111
1- Détermination de l'activité calcique extracellulaire.....	111
2- Enregistrements simultanés des variations potassique et calcique.....	111
3- Influence des ions calcium.....	114
4- Influence des ions cobalt.....	114
F- ETUDE COMPARATIVE DE LA DIFFUSION DU K DANS LES COUCHES GLOMERULAIRE ET PLEXIFORME.....	116
1- Evaluation théorique.....	116
2- Diffusion du K dans la couche glomérulaire.....	116
3- Diffusion du K dans la couche plexiforme externe.....	119
4- Effets de l'ouabaïne.....	119
G- EVALUATION BIOCHIMIQUE DES TAUX DE PROTEINES ET DE L'ACTIVITE Na,K-ATP-ASIQUE BULBAIRES.....	121
1- Détermination du contenu protéique.....	121
2- Activité Mg-ATPasique.....	123
a- Activité totale.....	123
b- Activité spécifique.....	123
3- Na,K-ATPases.....	125
a- Activité totale.....	125
b- Activité spécifique.....	125
4- Contrôle histologique.....	126

II- ETUDE ONTOGENETIQUE DE L'ACTIVITE DANS LE BULBE OLFACTIF DU RAT. EVOLUTION DE L'INHIBITION GABA-ERGIQUE

RESULTATS	128
A- DETERMINATION DE L'ACTIVITE POTASSIQUE EXTRACELLULAIRE.....	128
1- Période périnatale.....	128
2- Animaux âgés de 21 jours et plus.....	128
B- DETERMINATION DES FREQUENCES DES POTENTIELS EXTRACELLULAIRES.....	130
1- Période périnatale.....	130
2- Animaux âgés de 21 jours et plus.....	132
C- INHIBITION GABA-ERGIQUE.....	132
1- Période périnatale.....	132
a- Couches superficielles.....	132
b- Couches profondes.....	136
2- Animaux âgés de 3 à 7 jours.....	136
3- Animaux âgés de 21 jours et plus.....	136

III- DISCUSSION 139

A- METABOLISME MINERAL DANS LE BULBE OLFACTIF.....	139
1- Influence de la stimulation des afférences primaires sur l'activité potassique extracellulaire.....	140
2- Accumulation du K dans les glomérules olfactifs.....	141
3- Accumulation du K et dépolarisation des afférences primaires.....	142
4- Origine du pic K.....	145
5- Influence des ions sur le pic K.....	146
6- Pic K / pic Ca.....	147
7- Influence des neurotransmetteurs.....	148
8- Diffusion du K dans le bulbe olfactif.....	151
9- Répartition régionale des Na,K-ATPases.....	153
B- INHIBITION GABA-ERGIQUE DANS LE BULBE OLFACTIF.....	155
* Maturation de l'inhibition GABAergique.....	158

DISCUSSION GENERALE
ET CONCLUSION

160

A- TECHNIQUES.....	160
B- PRINCIPAUX RESULTATS.....	162
C- DISCUSSION GENERALE.....	165
1- Image olfactive.....	165
2- Unité glomérulaire.....	167
D- CONCLUSION GENERALE.....	170

REFERENCES

BIBLIOGRAPHIQUES.....	172
------------------------------	------------

ANNEXES.....	195
---------------------	------------

INTRODUCTION



INTRODUCTION

Le système olfactif périphérique principal se présente comme une mosaïque de neurorécepteurs et de cellules de soutien reposant sur une couche de cellules basales. La particularité essentielle de ce système est que le neurone sensitif joue le rôle de récepteur en contact quasi-direct avec le milieu extérieur mais il joue également le rôle de transducteur et d'émetteur. En effet, le message chimique y est transformé en signal électrique transmis aux structures olfactives centrales en passant par une structure de relais: le bulbe olfactif.

L'axone du neurone sensitif entre en contact avec l'élément de base du bulbe olfactif: la cellule mitrale dont l'axone est en contact direct avec le cerveau. Le traitement du signal olfactif commence au niveau de ce deutoneurone bulbaire grâce à l'existence de microcircuits inhibiteurs formés d'interneurones qui font synapse avec les dendrites des cellules mitrales mais aussi grâce aux fibres d'origine centrale se terminant dans les différentes couches bulbaires. Ainsi l'acquisition d'informations olfactives, l'encodage et le stockage provisoire de celles-ci au niveau du bulbe constituent une étape décisive dans l'intégration des signaux olfactifs mais aussi dans la mémorisation de ces signaux.

Enfin, l'axone de la cellule mitrale se termine au niveau de différentes structures centrales où a lieu l'interprétation et la mémorisation des odeurs perçues mais aussi le renforcement de l'aspect disymétrique des stimulations intéressant les deux narines, droite et gauche.

Après ce rappel schématique, nous allons donner des détails sur l'organisation structurale et sur les aspects électrophysiologiques et électrochimiques des deux structures que nous étudions ici, à savoir l'étage récepteur et le bulbe olfactif.

I - ETAGE RECEPTEUR

A- STRUCTURE

Chez les Vertébrés, la muqueuse olfactive qui tapisse les parois des cavités nasales, se déploie dans un espace de configuration complexe qui favorise le contact entre la surface sensorielle et le liquide odoriférant (HOLLEY et MAC LEOD, 1977). La complexité des cavités nasales rend,

cependant, difficiles certaines approches expérimentales comme la mise en place d'électrodes d'enregistrement. Pour contourner la difficulté, nous allons utiliser un modèle animal de configuration moins complexe: l'épithélium olfactif de grenouille.

La muqueuse est subdivisée en un épithélium olfactif et une sous-muqueuse.

L'épithélium est composé de trois catégories de cellules (Fig 1):

- Les neurorécepteurs (80 à 85% des cellules de l'épithélium, FARBMAN, 1986, chez le rat); ce sont des cellules bipolaires dont la dendrite se termine par une vésicule olfactive qui émerge dans le mucus et qui porte un certain nombre de cils (6 à 8 chez la grenouille, REESE, 1965). Les cils varient, selon les espèces, en nombre mais aussi en longueur (25 à 200 μm , REESE, 1965) et en mobilité. Chez la grenouille il y'a des cils courts et mobiles et d'autres plus longs et moins mobiles (REESE, 1965; BRONSTEIN et LEONT'EV, 1972; MAIR *et al*, 1982a). Ils sont le premier point de contact entre les molécules odorantes et le neurorécepteur, et par conséquent, l'élément transducteur initial de la cellule réceptrice. L'axone du neurorécepteur s'enfonce vers la lame basale enveloppé avec d'autres axones par certaines cellules basales, puis par des cellules de Schwann. Les faisceaux d'axones ainsi formés se dirigent au sein du nerf olfactif vers le bulbe.

-Les cellules de soutien (12 à 15% des cellules épithéliales, FARBMAN, 1986) ont leur surface apicale pourvue de microvillosités émergeant dans le mucus. Elles ont un rôle sécrétoire (OKANO et TAKAGI, 1974).

-Les cellules basales (5% des cellules épithéliales, FARBMAN,1986) constituent une couche profonde et pourraient représenter, du moins pour certaines d'entre elles, des cellules souches pour les neurorécepteurs et les cellules de soutien (FARBMAN, 1986).

La sous-muqueuse contient en plus des faisceaux axoniques et des vaisseaux sanguins, des glandes sécrétant le mucus: les glandes de BOWMAN dont le conduit s'ouvre à la surface de l'épithélium.

Le mucus a une épaisseur moyenne de 30 μm environ chez la grenouille (REESE, 1965); il paraît stratifié, plus visqueux en surface qu'au contact de l'épithélium. Il est continuellement renouvelé, la vitesse de drainage de l'épithélium a été estimée à 1mm/sec.(MOULTON et BEIDLER,

1967). La composition du mucus est mal connue et encore moins sa composition en électrolytes. Cependant, une teneur élevée en cations Na^+ et K^+ a été mesurée par spectrophotométrie de flamme (BRONSTEIN et LEONTEV, 1972.)

B- PROPRIETES ELECTROPHYSIOLOGIQUES

L'impact des molécules odorantes sur les membranes des cils provoque l'apparition d'une dépolarisation (GETCHELL, 1977) et la somme de plusieurs dépolarisations a été mesurée sous forme d'un potentiel lent négatif appelé électroolfactogramme (OTTOSON, 1956). L'électroolfactogramme (E.O.G.) est décomposé en trois phases: une phase rapide de dépolarisation et deux phases de repolarisation, une rapide et une lente (OTTOSON, 1956; LEVETEAU et MAC LEOD, 1966; Le MAGNEN, 1968). TAKAGI *et al* (1968) ont mis en évidence le rôle des cations (Ca^{++} , K^+ et Na^+) dans la genèse de l'EOG. D'autres réponses dépolarisantes ont été enregistrées au niveau des cellules de soutien et pourraient avoir comme origine la dépolarisation de celles-ci par l'accumulation de potassium produit par l'activation des neurorécepteurs (GETCHELL, 1977; TROTIER et MAC LEOD, 1986)

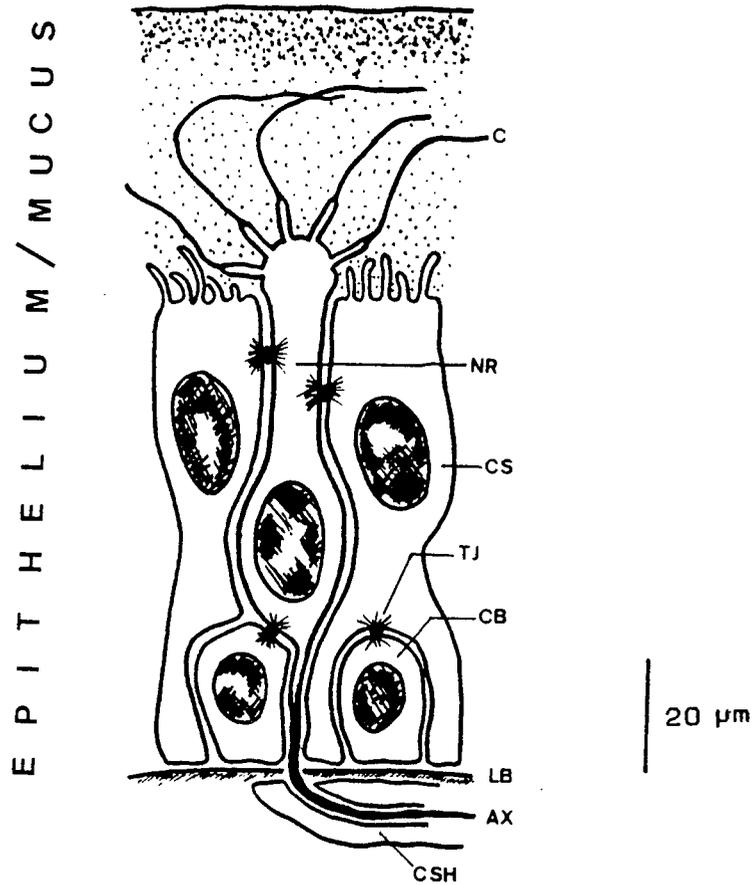


FIGURE 1:

- Coupe schématique de l'épithélium montrant en surface le mucus et en profondeur l'épithélium proprement dit.

NR : neurorécepteur

C : cil

CS : cellule de soutien

CB : cellule basale

LB : lame basale

AX : axone

CSH : cellule de Schwann

TJ : tight-junction

II-LE BULBE OLFACTIF

Le bulbe olfactif est localisé chez les Vertébrés au niveau du pôle rostral du cerveau antérieur. Dans cette position de relais, il reçoit des fibres afférentes des cellules réceptrices et projette des fibres vers le cerveau antérieur. De plus, il existe un contingent de fibres qui connecte le cerveau au bulbe l'incorporant, ainsi, dans les systèmes centraux contrôlant le comportement limbique.

A - ORGANISATIONS STRUCTURALE ET ULTRASTRUCTURALE

PINCHING (1972, rapporté par HOLLEY et MAC LEOD, 1977) a émis la possibilité de subdiviser le bulbe, sur des bases anatomiques, en deux parties. Un étage glomérulaire où s'effectue la réception des afférences primaires et où a lieu le premier microcircuit inhibiteur bulbaire (SHEPHERD, 1978). Puis, une zone plus profonde correspondant aux autres couches et possédant des interneurones propres (Fig. 2).

1 - Niveau glomérulaire

a - Organisation des fibres afférentes dans le glomérule

Les axones du nerf olfactif, d'un diamètre moyen de $0,2 \mu\text{m}$ (MOULTON et BEIDLER, 1967), ne bifurquent pas avant d'avoir atteint le glomérule au sein duquel tous les axones se terminent et dont aucun ne traverse en direction des couches profondes. Ce confinement très strict des terminaisons du nerf olfactif au niveau de la couche glomérulaire est une des caractéristiques de l'organisation bulbaire. De plus, il fait de cette couche une des régions du système nerveux présentant la plus grande densité de terminaisons axoniques afférentes (SHEPHERD, 1972).

Chez les mammifères, les glomérules sont bien individualisés et mesurent jusqu'à $150 \mu\text{m}$ chez le rat (REESE et BRIGHTMAN, 1971). Outre les terminaisons des axones du nerf olfactif, ils contiennent les processus dendritiques des dentoneurones (cellules mitrales/ cellules à panache) et des interneurones (cellules périglomérulaires) bulbaires.

Compte tenu du nombre restreint de glomérules (3500 chez le rat, MEISAMI et SAFARI, 1977) et compte tenu du fait que des millions de fibres entrent dans chaque glomérule, une convergence massive (facteur 1000) s'opère dans chaque glomérule (HOLLEY et MAC LEOD, 1977).

L'organisation des axones du nerf olfactif dans le glomérule peut être caractérisée par plusieurs niveaux structuraux résumés comme suit par SHEPHERD (1972) :

- parcellement de la population totale des fibres du nerf olfactif dans différents glomérules.
- fractionnement des faisceaux d'axones en unités contenant 25 à 100 axones et séparées par des cellules gliales.
- organisation en palissades de terminaisons axoniques.
- le quatrième niveau concerne toutes les connexions que l'axone d'une cellule réceptrice (qui ne se ramifie qu'à l'intérieur du glomérule), peut établir avec les éléments postsynaptiques.
- le dernier étant la synapse individuelle, établie avec un élément postsynaptique spécifique (cf Fig.2).

b - Organisation synaptique

Une distinction fondamentale est faite (SHEPHERD, 1972) entre les connexions intraglomérulaires qui relient les éléments neuronaux au sein du glomérule et les connexions interglomérulaires par lesquelles s'opère l'interaction entre glomérules.

- Connexions intraglomérulaires : les sites de terminaison des axones du nerf olfactif sont les arborisations dendritiques des deutoneurones et des cellules périglomérulaires (PINCHING et POWELL, 1971a, REESE et SHEPHERD, 1972, WHITE, 1972).

Outre les contacts qu'elles reçoivent des axones du nerf olfactif, les dendrites primaires des deutoneurones bulbaires établissent des synapses dendrodendritiques réciproques avec les cellules périglomérulaires. Ces

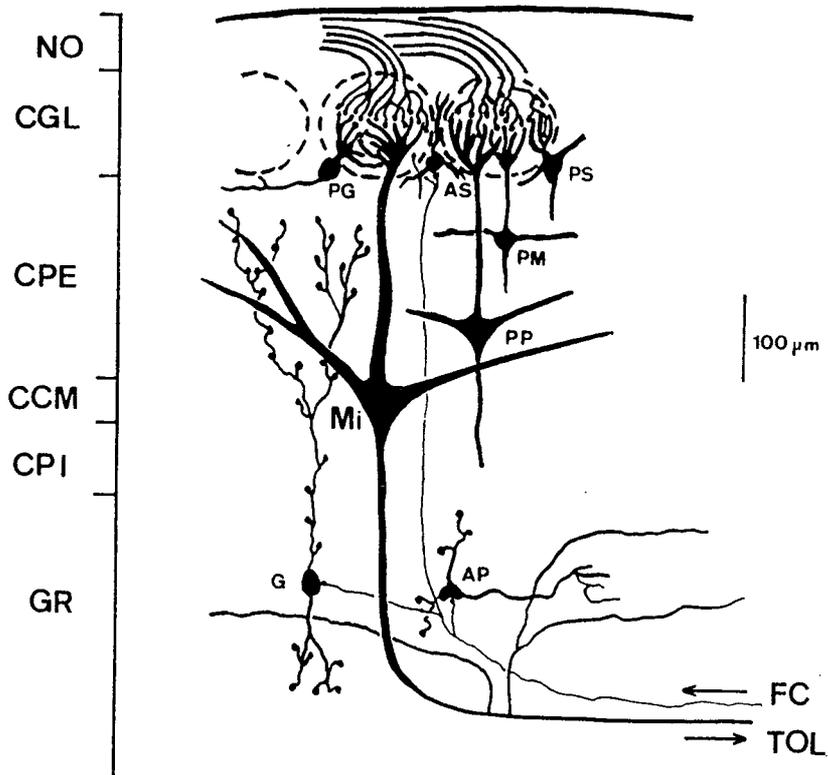


FIGURE 2 :

Coupe schématique du bulbe olfactif de Mammifère montrant l'organisation des principaux types neuronaux en couches distinctes. En partant de la surface nous distinguons :

- NO : couche du nerf olfactif*
- CGL : couche glomérulaire*
- CPE : couche plexiforme externe*
- CCM : couche des cellules mitrales*
- CPL : couche plexiforme interne*
- GR : couche granulaire*

Les principaux neurones et interneurones sont :

- Mi : cellule mitrale*
- PP : cellule à panache profonde*
- PM : cellule à panache moyenne*
- PS : cellule à panache superficielle*
- AS : cellule à axone court superficielle*
- AP : cellule à axone court profonde*
- PG : cellule périglomérulaire*
- G : cellule granulaire*

Les connexions avec le cerveau se font par :

- TOL : tractus olfactif latéral*
- FC : fibres d'origine centrale*

(D'après HOLLEY et MAC LEOD, 1977; HALASZ et SHEPHERD, 1983; MORI, 1987)

synapses sont excitatrices dans le sens deutoneurone-interneurone et inhibitrices dans le sens inverse (PINCHING 1970, PINCHING et POWELL, 1971b, WHITE, 1972).

Dans le même glomérule, il existe un très grand nombre de synapses donc d'interactions excitatrices et/ou inhibitrices qui sont probablement synchrones (SHEPHERD,1972). Ceci étayerait l'hypothèse selon laquelle chaque glomérule représenterait une unité fonctionnelle impliquée dans le codage des informations olfactives (LEVETEAU et MAC LEOD,1966).

- Connexions interglomérulaires: elles s'établissent par la voie des axones des cellules périglomérulaires, à panache superficielles, classées dans la catégorie des interneurons (SCHOENFELD et MACRIDES,1984), et les cellules à axone court superficielles (SHEPHERD,1972).

La région périglomérulaire se caractérise par la grande densité en corps cellulaires des cellules périglomérulaires, qui entourent et démarquent chaque glomérule. Les membranes de ces cellules sont en contact étroit et des lamelles gliales sont intercalées entre les processus neuronaux de ces cellules périglomérulaires (PINCHING,1970).

La maturation ontogénétique de ce niveau glomérule comporte deux traits essentiels. D'une part, et c'est une particularité unique dans tout le S.N., le N.O. est constitué d'axones qui sont à différents stades de croissance, de maturation et de dégénérescence (HALASZ et SHEPHERD,1983) ceci étant du au renouvellement continu des cellules réceptrices (GRAZIADEI et MONTI-GRAZIADEI,1978). D'autre part, la mise en place du circuit inhibiteur constitué par les synapses dendrodendritiques établies entre les cellules périglomérulaires et les dendrites des cellules mitrales est précoce par rapport aux autres régions bulbaires, notamment la couche plexiforme externe (HINDS et HINDS, 1976). Cependant les glomérules ne sont identifiables qu'à partir du deuxième jour de vie postnatale (MATH, 1984).

2- Couches profondes.

a- Organisation anatomique

Les cellules mitrales et les cellules à panache profondes et moyennes constituent les deutoneurons du bulbe olfactif principal du Mammifère.

Les cellules mitrales ont des corps cellulaires de grande taille (10 à 15 μm) formant l'assise des cellules mitrales. Les corps cellulaires des cellules à panache profondes et moyennes sont répartis à travers toute la couche plexiforme externe. Ces deutoneurones possèdent deux sortes de dendrites. Ils ne possèdent, généralement, qu'une seule dendrite primaire qui se projette dans un seul glomérule où elle se ramifie abondamment. Ultérieurement, plusieurs dendrites secondaires s'étendent à partir du corps cellulaire essentiellement dans la couche plexiforme externe (MORI *et al*, 1981; ORONA *et al*, 1984). Ces dendrites peuvent s'étendre tangentiellement sur de grandes distances (ORONA *et al*, 1984) et cette extension, vue son étendue spatiale, a d'importantes implications fonctionnelles dans l'interaction synaptique entre différents neurones bulbaire (MORI, 1987). L'axone prend naissance au niveau de la partie profonde de la cellule et traverse les couches plexiforme interne et granulaire où il émet des collatérales qui s'étendent elles aussi sur de grandes distances (KISHI *et al*, 1984). Les axones des deutoneurones quittent le bulbe olfactif par le tractus olfactif latéral (T.O.L.) qui se termine principalement dans le cortex pyriforme, le cortex préamygdalien ou dans différentes parties du noyau olfactif antérieur (HOLLEY et MAC LEOD, 1977).

b-Organisation synaptique

Les dendrites des cellules mitrales établissent de nombreuses synapses dendrodendritiques réciproques avec les gemmules des cellules granulaires (RALL *et al*, 1966; RALL et SHEPHERD, 1972; SHEPHERD, 1972). Ces synapses sont largement distribuées sur les cellules mitrales (SHEPHERD, 1972). La partie mitrale-granule de la synapse est excitatrice tandis que la partie granule-mitral est exclusivement inhibitrice (YAMAMOTO *et al*, 1963; MORI et TAKAGI, 1978; MORI *et al*, 1981) et exerce un contrôle sur le signal quittant le bulbe par le tractus olfactif latéral.

Les axones de certaines cellules à axone court profondes entrent en contact avec les épines dendritiques des cellules granulaires (PRICE et POWELL, 1970a). Ces cellules à axone court exerceraient un contrôle sur l'activité des cellules granulaires (MORI et KISHI, 1982).

L'étude de HINDS et HINDS (1976) sur la formation des synapses dans le bulbe olfactif fait apparaître que le développement ontogénétique des synapses dans la couche plexiforme externe est tardif par rapport à celui

observé dans la couche glomérulaire. Cependant, la densité volumétrique et le nombre de synapses augmentent considérablement durant la période postnatale. Ainsi des synapses dendrodendritiques sont-elles détectées dans la couche plexiforme externe à partir du premier jour de vie postnatale. La partie granule-mitrale de la synapse réciproque se forme, sur la même gemmule, près d'une synapse mitrale-granule préexistante.

B-INNERVATION DU BULBE

L'activité du bulbe est soumise à une influence d'origine centrale. Ainsi de nombreuses fibres centrifuges traversent-elles les couches profondes du bulbe pour venir innover essentiellement les couches granulaire et plexiforme externe mais aussi la couche glomérulaire où les fibres se terminent dans la région périglomérulaire (HOLLEY et MAC LEOD, 1977).

Certaines de ces fibres proviennent du cortex olfactif, d'autres sont des fibres commissurales provenant du noyau olfactif antérieur, d'autres encore prennent naissance dans le noyau de la bandelette diagonale (PRICE et POWELL, 1970b; REESE et SHEPHERD, 1972).

C - PROPRIETES FONCTIONNELLES

Les cellules mitrales et à panache sont activées par les terminaisons des axones du nerf olfactif et leur activité est modulée par deux microcircuits d'interneurones locaux. Le premier microcircuit est formé par les cellules périglomérulaires et à axone court superficielles, quant au second, il est formé par les cellules granulaires et les cellules à axone court profondes. Les interneurones primaires (cellules périglomérulaires et granulaires) sont excités par les deutoneurones et rétroagissent sur ces derniers via les synapses dendrodendritiques réciproques (SHEPHERD, 1972, 1978).

1 - Données électrophysiologiques

a-Activité électrique

La majorité des données électrophysiologiques sur le bulbe olfactif a été obtenue en observant diverses manifestations de l'activité électrique bulbaire (potentiel glomérulaire, potentiels évoqués, activité unitaire, entre autres) en réponse à des stimulations des voies afférentes et/ou efférentes. LEVETEAU et MAC LEOD (1966) ont enregistré en réponse à une stimulation odorante, une variation de potentiel de longue durée et d'amplitude variable au niveau de la couche glomérulaire. Cette variation, qu'ils ont appelée potentiel glomérulaire précède de quelques dizaines de msec l'apparition de l'E.O.G. épithélial. Ces auteurs ont, par ailleurs, suggéré l'existence d'une fonction discriminatrice du glomérule en tant qu'unité fonctionnelle.

La stimulation orthodromique du N.O. (FREEMAN, 1974a) aussi bien que la stimulation antidromique du T.O.L. (RALL et SHEPHERD, 1968), produisent un courant extracellulaire centré au niveau des cellules mitrales. La différence entre ces deux réponses évoquées réside dans la sensibilité à l'intensité du stimulus dont l'accroissement fait baisser voire disparaître la réponse à la stimulation du N.O. (FREEMAN, 1974a,b). Ceci a permis à cet auteur d'introduire la notion d'atténuation de la transmission glomérulaire.

Un phénomène d'atténuation des P.P.S.E. en réponse à une stimulation du N.O., a également été rapporté (MORI *et al*, 1984). Cette dépression des P.P.S.E. serait localisée au niveau de la partie apicale des arbres dendritiques des cellules mitrales et serait indépendante de l'inhibition des cellules mitrales par les cellules granulaires (MORI, 1987).

L'activation des cellules granulaires provoque l'apparition de P.P.S.I. dans la cellule mitrale (MORI *et al*, 1981; 1984; MORI, 1987). Ces P.P.S.I. représentent l'activation des synapses dendrodendritiques dans le sens granule-mitral (MORI, 1987); ils se produisent donc au niveau de sites distincts du site de production de la phase initiale du P.P.S.E. c'est-à-dire au niveau de la portion apicale de la dendrite primaire (MORI *et al*, 1981; NOWYCKY *et al*, 1981).

b - Aspects ioniques

Les préparations de bulbes olfactifs isolés ont permis d'analyser les conductances membranaires responsables de la production de spikes dans la cellule mitrale. Le potentiel d'action de la cellule mitrale a deux composantes, une sodique et une calcique (JAHR et NICOLL, 1980; MORI, 1987). Le rôle du calcium, en plus du fait qu'il représente une partie du courant véhiculant le potentiel d'action, est important dans la modulation de l'activité de la cellule mitrale (MATH et DAVRAINVILLE, 1980) ou dans la libération de neurotransmetteur(s) excitateur(s) par la cellule mitrale (HALASZ et SHEPHERD, 1983). De plus, la composante calcique du P.A. de la cellule mitrale serait sous l'influence de conductances potassiques calcium- ou voltage-dépendantes (MORI, 1987).

Pendant l'inhibition de la cellule mitrale, une augmentation de la conductance membranaire est observée durant les phases initiales du P.P.S.I. mais elle décroît au cours de la phase tardive constituée par le potentiel d'hyperpolarisation (MORI *et al*, 1984; MORI, 1987).

Au niveau de la dendrite primaire, l'inhibition est caractérisée par l'activation d'une conductance membranaire supplémentaire (MORI *et al*, 1984). L'inhibition au niveau de la portion distale de cette dendrite inclurait d'autres mécanismes comme la diminution ou la suppression de la libération de neurotransmetteur(s) par les arborisations des axones du N.O. ou par accumulation de substances non-spécifiques (ions, neurotransmetteurs) dans les espaces extracellulaires (FREEMAN, 1974b).

L'enregistrement avec des électrodes potassium-sensitives dans le bulbe olfactif isolé (JAHR et NICOLL, 1981) a montré que la dépolarisation des fibres du N.O. était accompagnée d'une augmentation de la concentration extracellulaire en ions potassium qui favorisait la dépolarisation des fibres adjacentes inactives. Cette augmentation est maximale dans la couche glomérulaire et pourrait avoir un effet sur l'activité de la dendrite primaire de la cellule mitrale (FREEMAN, 1974b; JAHR et NICOLL, 1981; MARTINEZ et FREEMAN, 1984; MORI *et al*, 1984).

2 - Données biochimiques

a - Neurotransmetteurs

Le bulbe olfactif présente une grande diversité de neurotransmetteurs et de neuromodulateurs. Les études traitant du sujet ont donné lieu à de nombreuses revues (HALASZ *et al* 1977, 1978, 1979, HALASZ et SHEPHERD, 1983) dont nous tirons les données qui suivent.

Le caractère de neurotransmetteur n'est pas démontré pour toutes les substances rencontrées dans le bulbe olfactif et l'identification du transmetteur excitateur libéré par les terminaisons du nerf olfactif fait toujours défaut, du moins chez les Mammifères.

α -Acides aminés

Des acides aminés tels que l'aspartate et le glutamate ont été proposés comme neurotransmetteurs utilisés par la cellule mitrale (HALASZ et SHEPHERD, 1983, MATH, 1984). Par ailleurs, le glutamate peut induire la libération de GABA par les interneurons bulbaires (JAHR et NICOLL, 1982).

Le caractère putatif du GABA a été largement démontré dans le bulbe qui contient de grandes quantités de cet acide aminé et de son enzyme de synthèse la GAD (HALASZ et SHEPHERD, 1983). La majorité des interneurons primaires montre en effet, une immunoréactivité positive à un antisérum de la GAD (RIBAK *et al* 1977, HALASZ *et al*, 1979; MUGNAINI *et al*, 1984).

Les études par autoradiographie du prélèvement du [³H] - GABA ont montré qu'outre le prélèvement important par les cellules gliales, le [³H] - GABA était essentiellement prélevé par les dendrites des cellules granulaires et périglomérulaires (HALASZ *et al*, 1979). Dans les glomérules, plusieurs éléments neuronaux qui pourraient être des gémules de cellules périglomérulaires ont été marqués par un sérum anti-GAD (MUGNAINI *et al*, 1984). Ceci est en faveur de l'hypothèse du premier microcircuit neuronal inhibiteur du bulbe constitué par les interneurons glomérulaires (SHEPHERD, 1978) qui va moduler les signaux afférents.

Au niveau du second microcircuit inhibiteur la cellule granulaire agit sur l'activité de la cellule mitrale par la libération de GABA (Mc LENNAN, 1971; MORI et TAKAGI, 1978; JAHR et NICOLL, 1980). Cette action inhibitrice de la cellule granulaire étant levée en présence d'antagonistes du GABA tels que la bicuculline ou la picrotoxine (FELIX et Mc LENNAN, 1971; Mc LENNAN, 1971).

β- Amines biogènes

Certaines cellules périglomérulaires montrent une immunoréactivité négative au sérum anti-GAD (RIBAK *et al*, 1977) et correspondent à des cellules dopaminergiques (HALASZ *et al*, 1977, 1978, DAVIS et MACRIDES, 1983; BAKER *et al*, 1983). Ces cellules périglomérulaires dopaminergiques représenteraient 20% de la population de cellules périglomérulaires; elles agiraient par une modulation à long terme de l'activité glomérulaire (MUGNAINI *et al*, 1984).

Outre les catécholamines, le bulbe olfactif contient d'autres amines biogènes comme la sérotonine. En effet, des fibres sérotoninergiques centrales originaires du raphé et du locus coeruleus (SHIPLEY *et al*, 1985) dont les terminaisons sont les plus denses au niveau glomérulaire, ont été décrites dans certaines études (HALASZ *et al*, 1978, STEINBUSCH *et al*, 1978; STEINBUSCH, 1981).

Cependant, l'injection de sérotonine tritiée dans le ventricule olfactif a montré que les terminaisons marquées se trouvaient à l'intérieur même des glomérules et seraient des terminaisons axoniques en relation avec des dendrites de cellules périglomérulaires (HALASZ *et al*, 1978).

γ- Peptides et protéines

Un dipeptide, la carnosine, a été largement étudié dans le bulbe olfactif; il a été proposé comme neurotransmetteur au niveau des terminaisons des axones du nerf olfactif, sur la base d'un contenu important de carnosine (HARDING et MARGOLIS, 1976; Mac LEOD et STRAUGHAN, 1979). Cette possibilité n'est, cependant, pas totalement démontrée.

L'insuline, quant à elle, est présente en grandes quantités dans le bulbe olfactif (HAVRANKOVA *et al*, 1978); elle pourrait jouer un rôle important dans le contrôle du taux de glucose sanguin.

b - Métabolisme électrolytique

L'activité neuronale produit un efflux de K^+ hors des cellules nerveuses. Ce potassium peut s'accumuler dans les espaces extracellulaires et moduler, de ce fait, la libération de neurotransmetteurs. Il peut également provoquer, par la dépolarisation des afférences primaires (P.A.D.), une réduction de l'amplitude des potentiels véhiculés par les terminaisons des afférences primaires (SYKOVA, 1983). De plus, l'activation de certains récepteurs notamment, les récepteurs GABA-ergiques, se traduit par une modification de la composition en électrolytes du milieu extracellulaire. Les signaux ioniques détectés lors de l'activation des deux récepteurs GABA se manifestent comme suit :

- l'activation du récepteur GABA_A se traduit par un influx de chlorure accompagné d'un efflux parallèle de potassium (KRNJEVIC, 1981; SYKOVA, 1983). Le blocage de ce récepteur par la bicuculline se traduit, lui aussi, par un efflux ionique, en l'occurrence du potassium; mais l'origine des ions K^+ est, a priori, différente car elle résulterait de l'augmentation de la fréquence de décharge neuronale (NOWYCKY *et al*, 1981). Ce fait met, d'ailleurs, en évidence un des inconvénients de l'utilisation des flux ioniques dans la caractérisation de l'activation des récepteurs.

- l'activation du récepteur GABA_B, aussi bien par le GABA que par le baclofène (HILL et BOWERY, 1981), affecte en premier lieu les conductances calciques (DUNLAP et FISCHBACH, 1981). Si le récepteur GABA_B est essentiellement caractérisé par les flux calciques, il n'en demeure pas moins vrai que son activation provoque également un efflux de K^+ (DOLPHIN et SCOTT, 1986; ROBERTSON et TAYLOR, 1986). JAHR et NICOLL (1981) ont montré qu'au niveau de certaines afférences primaires, en l'occurrence celles du nerf olfactif, l'accumulation de K^+ , comme l'application de GABA, pouvait provoquer la dépolarisation des afférences primaires. Les effets de l'activation des récepteurs aux neurotransmetteurs et ceux de l'augmentation de aK se trouvent intimement imbriqués. Ainsi, l'élévation de aK peut-elle prendre part dans l'action pharmacologique des

neurotransmetteurs appliqués aux neurones mais elle peut masquer l'effet direct des substances appliquées (SYKOVA, 1983).

Les conséquences fonctionnelles de l'élévation de aK sont aussi bien post- que pré-synaptiques (SYKOVA, 1983). Considéré en parallèle avec la localisation des récepteurs GABA_B - dont certains sont localisés présynaptiquement de manière préférentielle (COLLINS *et al*, 1982) - cet aspect revêt une importance particulière dans le cadre de l'étude que nous allons envisager.

Dans ce contexte, la stimulation répétitive des afférences primaires, car elle implique d'importants mouvements ioniques, peut provoquer, à terme, une réduction de l'affinité des récepteurs aux neurotransmetteurs (BEN-ARI *et al*, 1979). L'action des ions quittant les cellules vers le milieu extra-cellulaire se trouve prolongée par leur accumulation dans les espaces intercellulaires. C'est le cas des ions potassium qui s'accumulent dans le voisinage immédiat des terminaisons qu'ils ont quittées (SYKOVA, 1981, 1983). Les ions K^+ accumulés au contact des éléments neuronaux, en modifient l'activité. Il a été possible de montrer, sur des préparations *in vitro* de bulbes olfactifs (JAHR et NICOLL, 1981), qu'une telle accumulation de K^+ se produit au niveau des terminaisons des afférences dépolarisées du nerf olfactif. Cet état transitoire s'achève par la redistribution du K^+ accumulé dans les espaces extra-cellulaires ou par recapture active et/ou passive par les cellules gliales et les éléments neuronaux. En effet, un accroissement du métabolisme oxydatif en corrélation avec l'accumulation du K^+ a été observé dans un certain nombre de régions du système nerveux (LEWIS et SCHUETTE, 1976; LOTHMAN *et al*, 1975; MAYEVSKY *et al*, 1974). Ceci suggère que cette augmentation de l'activité métabolique reflète la restauration active des gradients ioniques (SYKOVA, 1983).

L'équilibre électrolytique est essentiel pour la reprise de l'activité neuronale et la genèse du message sensoriel. Ainsi, la clearance des espaces extracellulaires du potassium qui peut s'y être accumulé, est-elle assurée par plusieurs mécanismes impliquant des facteurs actifs et/ou passifs. Les ions potassium peuvent diffuser librement et passivement d'abord dans les espaces extracellulaires, puis à travers la barrière hémato-encéphalique (SOMJEN *et al*, 1980; SYKOVA, 1981). Les cellules gliales prélèvent également de grandes quantités de potassium de manière passive à la suite de leur dépolarisation par l'accumulation extracellulaire de potassium. Les

cellules gliales agissent, ainsi, par un mécanisme appelé "*Spatial Buffering System*" (ORKAND *et al*, 1966, TRACHTENBERG et POLLEN, 1969).

En plus de ces mécanismes, il existe des processus agissant par l'activation des pompes membranaires - Na⁺, K⁺ - ATPases essentiellement - et qui représentent le principal mécanisme par lequel le K⁺ est prélevé (SYKOVA, 1983). Ce prélèvement de K⁺ par l'activation des pompes membranaires est l'apanage des éléments neuronaux, mais aussi des terminaisons des afférences primaires dont les glomérules olfactifs comportent une dense concentration et enfin des cellules gliales. Ces dernières sont très sensibles à l'augmentation de la concentration extracellulaire en potassium. L'activité Na⁺, K⁺ -ATPasique dans ces cellules semble être supérieure à celle des éléments neuronaux (HENN *et al*, 1972).

En ce qui concerne les ions calcium, ceux-ci jouent un rôle capital dans la transduction des signaux sensoriels, dans la libération de neurotransmetteurs et neuromodulateurs et dans la liaison des neurotransmetteurs avec les sites récepteurs. Ainsi, la liaison du GABA ou du baclofène avec les récepteurs GABA_B dépend de la présence d'ions calcium (MAJEWSKA et CHUANG, 1984). Ce cation extracellulaire joue également le rôle de second messenger dont la concentration intracellulaire est tellement faible qu'une très légère variation suffit pour provoquer une réponse cellulaire.

III - BUT DU TRAVAIL

La littérature que nous avons consultée avant d'aborder ce travail suggère une intervention directe des fluctuations du métabolisme minéral dans les mécanismes de transduction et de codage des informations olfactives. Nous tenterons dans cette étude d'apporter quelques éléments d'information susceptibles d'aider à la compréhension du fonctionnement du système olfactif périphérique.

Dans un premier temps, nous allons essayer, en utilisant l'épithélium olfactif de grenouille comme modèle d'étude, de répondre à certaines questions laissées en suspens dans la littérature (voir TROTIER et MAC LEOD, 1986) en quantifiant le degré de la participation de certains flux ioniques à la formation de l'électroolfactogramme, c'est à dire à la perception des odeurs.

Dans un deuxième temps, nous allons nous intéresser au codage des informations olfactives au niveau du bulbe olfactif. Celui-ci posait, quant à lui, deux problèmes, celui de la convergence des signaux afférents dans le même glomérule et celui de la compression dynamique de ces signaux avant qu'ils ne soient véhiculés par les deutoneurones bulbaires.

Nous allons envisager les répercussions de la neurotransmission sur les équilibres électrolytiques et l'influence de ceux-ci sur l'activité nerveuse, à travers la modulation de l'excitabilité des afférences primaires et de l'activité des neurones bulbaires par l'accumulation d'ions potassium dans les espaces extracellulaires et à travers l'étude de la maturation ontogénétique de l'inhibition GABAergique. L'accumulation extracellulaire d'ions potassium est démontrée dans la moelle épinière (SYKOVA, 1981, 1983) et suggérée au niveau des bulbes olfactifs (FREEMAN, 1974a; JAHR et NICOLL, 1981; MORI *et al*, 1984); de plus, le potassium semble prendre part dans la dépolarisation des afférences primaires (ECCLES, 1964; SYKOVA, 1983). Cet ensemble de données constitue, à nos yeux, une raison justifiée pour rechercher l'éventuelle existence de pareils phénomènes au niveau des glomérules olfactifs.

Outre l'épithélium olfactif de grenouille, l'autre modèle animal que nous avons choisi est le bulbe olfactif de rat. Cette structure se distingue par un certain nombre de particularités qui en font un excellent matériel d'étude. En effet, par son emplacement sur le trajet des voies olfactives, le bulbe olfactif constitue un cas particulier de structure nerveuse montrant une nette distinction entre les voies afférentes et les voies efférentes. De plus, son organisation anatomique révèle (*) une lamination stéréotypée des principaux types cellulaires en couches distinctes et de contour régulier. D'autre part, certaines couches comme la couche glomérulaire contiennent une grande agrégation de terminaisons afférentes. Enfin, l'abondance au niveau de l'organisation synaptique, de synapses réciproques de même que la richesse du bulbe olfactif, en substances neuroactives, font du bulbe une des régions du système nerveux contenant le plus de GABA.

(*) cf. Fig 2

MATERIELS ET METHODES

MATERIELS ET METHODES

I- CHOIX DES ANIMAUX

1- Etude de l'épithélium olfactif chez la grenouille verte

Pour des raisons d'ordre pratique, l'étude de la formation de l'électroolfactogramme et des flux ioniques qui y sont associés, a été réalisée sur un modèle animal dont les fosses nasales ont une configuration moins complexe que celle des Mammifères. En effet, nous avons choisi de travailler sur la grenouille verte *Rana temporaria* en raison de la facilité de l'abord du sac olfactif et de l'aisance de l'empalement de la surface épithéliale par plusieurs électrodes à la fois tout en contrôlant à l'aide d'un stéréomicroscope la position des électrodes d'enregistrement et l'état de la préparation.

2- Etude des bulbes olfactifs chez le rat blanc.

L'étude du bulbe olfactif a été réalisée chez le rat blanc de souche Wistar. Le choix de cet animal comme matériel d'étude est lié à des caractéristiques aussi bien fonctionnelles que pratiques. Citons, d'abord la facilité d'obtention des animaux et de leur élevage au laboratoire permettant de disposer d'animaux de différents âges. Le fait que le développement soit du type non précoce chez ce Mammifère constitue un critère fondamental du choix de l'animal pour l'étude de l'ontogénèse en général. En effet, la maturation des structures nerveuses, et en l'occurrence le bulbe olfactif, se poursuit pendant la période postnatale. Ainsi, la mise en place d'un certain nombre de synapses ainsi que la densité volumétrique de celles-ci, augmentent de manière considérable durant les derniers jours de vie fœtale et se poursuivent pendant les premiers jours de vie postnatale (BRUNJES et FRAZIER, 1986; HINDS et HINDS, 1976 a,b; MAIR *et al*,1982b).

L'obtention des animaux est réalisée en mettant deux femelles au contact d'un mâle reproducteur pendant une quinzaine de jours dans une cage métallique standard. Au bout de cette période, les femelles sont isolées chacune dans une cage pour attendre la mise-bas. La portée, comportant initialement douze jeunes en moyenne, est ramenée à six animaux pour

favoriser un développement optimal des jeunes. Les mères reçoivent un régime équilibré solide (nourriture type UAR A03 provenant du commerce) dont la valeur énergétique est d'environ 3200 cal. pour 1 kg ainsi que de l'eau en biberons changés régulièrement. Les femelles gestantes sont surveillées régulièrement à l'approche de la date présumée de mise-bas pour apprécier avec précision l'heure de celle-ci.

La température du local abritant l'élevage est maintenue à $23 \pm 1^\circ\text{C}$ et le cycle lumineux est diurne.

II- METHODES EXPERIMENTALES

A- PREPARATION DES ANIMAUX

1 - Abord de l'épithélium

Les grenouilles du genre *Rana temporaria*, provenant du commerce, sont déméduillées, partiellement décérébrées (le cerveau antérieur et les bulbes olfactifs sont épargnés), et placées sur une plaquette de liège le ventre vers le liège. Après immobilisation à l'aide d'épingles, une incision est pratiquée sous un stéréomicroscope et à l'aide d'une fine paire de ciseaux, en partant de la narine externe vers l'orbite; une seconde incision est pratiquée le long du plan de symétrie ce qui permet de dégager un volet qu'il suffit de sectionner pour mettre à nu la cavité nasale. Pour éviter la dessiccation du corps de l'animal et en particulier la surface épithéliale exposée, la grenouille est recouverte d'un morceau de papier filtre imbibé de Na Cl 0.9 %. Seules les grenouilles ayant un épithélium bien conservé, présentant des cils mobiles dans une couche de mucus translucide sont utilisées pour l'expérimentation.

2 - Abord des bulbes olfactifs.

Les rats des deux sexes, âgés de 0 à 45 jours, sont anesthésiés à l'équithésine (0.3 ml / 100 g de poids corporel), immobilisés au triéthiodure de gallamine (FLAXEDIL®, 0.5 ml / 100 g) et placés après trachéotomie sur une table à stéréotaxie (D. KOPF Instruments). La canule de trachéotomie est reliée à un respirateur artificiel (BRAUN) délivrant, selon l'âge des animaux 0.3 à 2.0 ml d'air par cycle à la température ambiante.

Trois électrodes d'acier implantées sous la peau, selon la dérivation aVF d'Einthoven et reliées à un amplificateur muni d'un haut-parleur, nous permettent de suivre en permanence l'électrocardiogramme des animaux.

La procédure chirurgicale consiste à scalper l'animal, la peau du crâne étant au besoin injectée de Xylocaïne à 5 %, puis à enlever les aponevroses adhérant au crâne et à pratiquer des ouvertures sous forme de petites fenêtres circulaires à l'aplomb des bulbes olfactifs. Pour ce faire, nous utilisons des pinces très fines pour les jeunes animaux et un trépan (ANTOGRYR) pour les animaux dont le crâne est ossifié. L'ultime étape consiste en une dissection très fine, à l'aide de micropipettes de verre biseautées, de l'arachnoïde et des méninges sans léser la vascularisation.

Les bulbes olfactifs ainsi exposés sont recouverts d'un tampon imbibé de Na Cl 0.9 % pour éviter leur dessèchement; pendant les enregistrements, un drainage régulier des surfaces exposées par une solution de Na Cl 0.9 % œuvre dans le même sens.

B- METHODES ELECTROPHYSIOLOGIQUES

1- Microélectrodes de verre (voir THOMAS, 1978)

L'introduction des microélectrodes de verre par LING et GERARD (1949) a permis l'enregistrement, dans les phases intra- et extra-cellulaires, de l'activité électrophysiologique de plusieurs types de cellules.

L'impédance d'une bonne électrode d'enregistrement varie entre 5 et 50 M Ω (LONGENECKER et URSCHEL, 1976) et la valeur de cette impédance est fonction du diamètre de la pointe, qui est souvent de 1 à 2 μm , et de la solution de remplissage.

a - Micropipette simple.

Des tubes de verre (Borosilicate, CLARK ELECTROMEDICAL INSTRUMENTS; G.C. 150 F) d'un diamètre interne de 0.86 mm, pourvus d'un filament capillaire en verre accolé à la paroi interne pour faciliter le remplissage, sont étirés sur une étireuse verticale conçue au laboratoire. Le réglage préalable de l'intensité de chauffage du filament incandescent de l'étireuse ainsi que de la vitesse de chute du mors libre soutenu par un piston, nous permet d'obtenir des électrodes ayant une longue pointe (1 cm et plus si nécessaire) et un diamètre de pointe de 1 à 2 μm et moins (Fig 3).

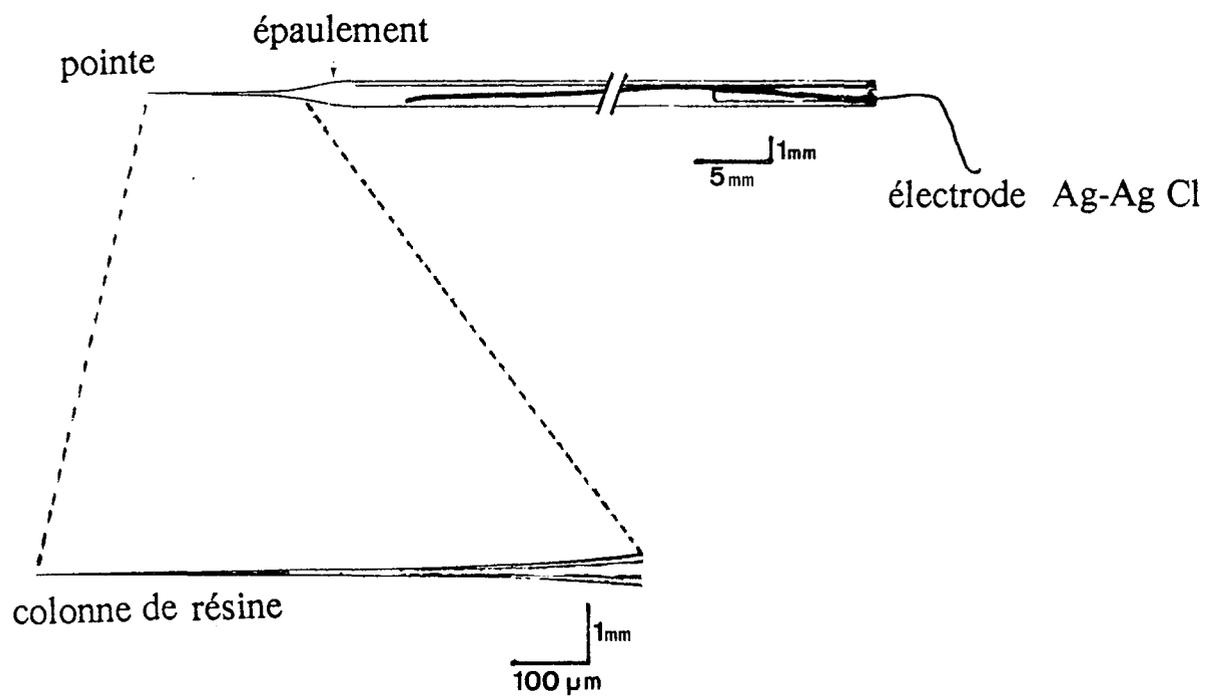


FIGURE 3:
Schémas d'une électrode ion-sensible.

Les micropipettes ainsi obtenues, sont plongées par l'extrémité non étirée dans une solution de Na Cl 165 mM, ce qui permet un remplissage de la pointe sans formation de bulles comme c'est souvent le cas lors de l'utilisation d'une canule. La partie restante de la micropipette est remplie à l'aide d'un cathéter relié à une seringue contenant la solution de remplissage appropriée (Na Cl ou K Cl.)

Ce type d'électrode simple nous servira comme électrode extracellulaire soit pour enregistrer l'EOG ou les PA extracellulaires soit comme électrode de référence pour les électrodes ion-sensitives. Dans ce deuxième cas, l'utilisation de l'électrode de référence est obligatoire pour enregistrer tous les autres types d'activité électriques non relatives à l'activité de l'ion mesurée par la MIS et les soustraire du signal récupéré par la MIS pour éviter la distorsion de celui-ci.

b - Micropipettes d'iontophorèse.

Pour la préparation de ces pipettes nous utilisons des microtubes triples (CLARK ELECTROMEDICAL Inst., 3 G.C. 120 F) auxquels nous faisons subir, sur l'étireuse et à chaud, une torsion de 60° pour que les pointes ne se séparent pas pendant l'étirement. Après vérification de la qualité de la pointe (absence de séparation ou de fusion des trois canaux) et de son diamètre total (2 à 3 μm), nous procédons au remplissage des pointes en plongeant l'extrémité non étirée dans de l'eau bidistillée. L'eau monte par capillarité jusqu'à l'épaule; il ne reste plus, alors, qu'à remplir les différents compartiments à l'aide de fins cathéters reliés à des seringues contenant des solutions de différentes substances.

Les substances utilisées, leurs concentrations, leur pH et leur origine commerciale sont données dans le tableau suivant:

Substance en solution dans Na Cl 165 mM	Concentration (M)	pH	Origine Commerciale
Na Cl	0.165	7.0	MERCK
K Cl	0.1 à 1.0	"	"
Ca Cl ₂	0.1 à 1.0	"	"
Co Cl ₂	0.1	"	"
GABA	0.5	4.0	SIGMA
Baclofène (LIORESAL®)	0.01	3.0	CIBA-GEIGY
Bicuculline	0.01	3.0	SIGMA
Dopamine	0.1	3.0	"
Sérotonine	0.01	5.0	SERVA
Carnosine	0.1	5.0	SIGMA
Halopéridol (HALDOL®)	0.005	5.0	Lab. JANSSEN
EGTA	0.07	3.0	SIGMA

Les micropipettes sont accolées à la MIS épaulement contre épaulement, en respectant un écartement de 5 à 6 μm entre les pointes.

c - Microélectrodes ion-sensitives (voir THOMAS, 1978 et SYKOVA, HINK et VYKLICKY Eds, 1981.)

α -Généralités

L'avènement et le développement de la technique des électrodes ion-sensitives (LUX, 1974; SYKOVA et al, 1981; SYKOVA, 1983; VYSKOCIL *et al*, 1972; WALKER, 1971; WALKER et BROWN, 1977), ont offert de très grandes possibilités de mesure directe et ponctuelle des mouvements ioniques accompagnant l'activité neuronale. Les caractéristiques essentielles de cet outil de choix résident dans sa sensibilité et sa sélectivité vis-à-vis de l'activité d'un ion donné, ce qui minimise de façon notable les interférences provoquées par d'autres ions. Ainsi, la compréhension du fonctionnement neuronal et la corrélation entre un type donné d'activité et ses répercussions sur les flux ioniques deviennent-elles plus commodes, plus dynamiques et plus instantanées. De plus la miniaturisation de ces électrodes qui peuvent

avoir un très faible diamètre de pointe, permet d'empaler, sans la léser, une unité neuronale. Ceci rend plus accessible la mise en valeur de la contribution unitaire d'un neurone à l'activité nerveuse globale. Les mesures des changements dynamiques de la composition intra- et/ou extra-cellulaire en potassium, par exemple, ont permis de déterminer le rôle de l'accumulation du K dans les espaces extracellulaires durant l'activité normale ou pathologique (épilepsie, anoxie, ischémie, dépression envahissante...).

Les micropipettes préalablement étirées sont rendues sélectives en remplissant leur pointe d'une colonne d'échangeur d'ion sur 300 à 400 μm . Pour les électrodes potassium, nous utilisons une résine du type Corning (Code 477317, World PRECISION INSTRUMENTS), et un transporteur neutre (ETH 1001, SIMON et al, 1978) pour les électrodes calcium. Les échangeurs d'ions sont des "membranes" liquides constituées d'une couche de solvant dont les deux surfaces sont en contact avec des solutions aqueuses. La matrice (polymères) de cette "membrane" prend peu d'importance dans l'établissement des propriétés de l'échangeur d'ion mais elle influence le transport ionique au sein de la résine. Les ions transférés à travers l'une des interfaces résine-solution aqueuse, sont transportés dans la résine au sein de laquelle ils sont échangés avec des composants de l'échangeur d'ion. En effet, la résine contient, entre autres, un anion hydrophobe s'échangeant avec l'ion mesuré et un anion hydrophile empêchant l'anion en solution d'entrer dans la "membrane" (KORYTA, 1981).

β - Fabrication

La paroi du verre est recouverte de groupements hydroxyles sur lesquels l'eau peut s'adsorber; de plus le verre a une conductibilité non négligeable qui peut favoriser la fuite de conductances le long de l'interface verre-résine de remplissage, court-circuitant ainsi la d.d.p. issue des différences de concentration de l'ion étudié (LONGENECKER et URSCHER, 1976). Un traitement préalable de la paroi interne du verre étiré afin de la rendre hydrophobe et permettre un meilleur ancrage de la résine est donc nécessaire pour contrecarrer les problèmes décrits plus haut. A ces fins, nous procédons à un siliconage de la pointe de la pipette en la trempant dans une solution de dichlorodiméthylsilane à 6%, V/V dans du tétrachlorure de carbone. Les groupements O-H du verre réagissent avec le

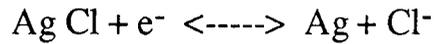
silicone et sont, alors transformés en groupements hydrophobes (MUNOZ *et al*, 1983). La solution de silicone monte par capillarité dans la pointe de la pipette et après évaporation de la colonne de silicone (à la température ambiante), nous chassons les résidus de silicone en exerçant une pression (1 à 1.5 bar) sur une seringue reliée par un tube en caoutchouc à l'extrémité de la pipette. L'opération est menée sous contrôle optique; elle est répétée trois fois pour assurer un meilleur siliconage. Nous faisons évaporer les microgouttelettes résiduelles en disposant la pointe près d'une source de chaleur (lampe de paillasse) tout en continuant à exercer une pression sur le piston de la seringue remplie d'air.

Ensuite, la micropipette est remplie d'eau bidistillée jusqu'à son épaulement. Nous profitons de cette étape pour vérifier si une simple pression sur le piston de la seringue fait sortir une gouttelette d'eau de la pointe, ce qui nous assure que celle-ci n'est pas bouchée par les éventuels résidus de silicone qui en séchant peuvent obstruer le canal de la pointe. Cette étape étant menée à bien, nous procédons au remplissage de la pointe par la résine, en la plongeant, sous contrôle optique et à l'aide d'un micromanipulateur, dans une goutte de résine contenue dans un verre de montre. L'ascension de la résine se fait par simple capillarité, chassant la colonne d'eau vers le haut; elle s'arrête de monter dans le canal quand toute la surface siliconnée a été recouverte de résine. Les opérations délicates étant terminées, il suffit alors de remplir la pipette d'une solution conductrice appropriée (solution de K Cl 0.1 M pour les K-MIS, et solution de Ca Cl₂ 0.1 M pour les Ca-MIS) et à y accoler une électrode de référence remplie de Na Cl 0.165 M. La MIS est ainsi prête à l'utilisation immédiate.

La fabrication des électrodes MIS est difficile à standardiser mais malgré les difficultés rencontrées, notamment pendant la délicate phase de siliconage qui détermine l'état de la future MIS, nous avons toujours travaillé avec des MIS fabriquées quelques heures seulement avant le début des enregistrements.

La MIS ainsi réalisée est apte à détecter toute variation de l'activité de l'ion étudié dans le milieu d'enregistrement. Pour que les oscillations de la d.d.p., régies par la loi de NERNST, puissent être mesurables, il faut insérer la source de la d.d.p. dans un circuit où le courant puisse circuler. La circulation du courant dans la solution de remplissage de la pipette est rendue possible grâce à l'utilisation d'électrodes d'argent chlorurées (électrodes Ag-

Ag Cl) reliant la MIS à l'amplificateur différentiel. Dans l'électrode de mesure se produit la réaction :



dans laquelle un électron se combine à Ag Cl libérant à partir du métal chloruré un anion Cl⁻ dans la solution, ce qui permet à l'électron de propager le courant (LONGENECKER et URSCHEL, 1976). Il en est de même pour l'électrode de référence remplie d'une solution de Na Cl dans laquelle plonge une électrode Ag-Ag Cl. Les électrodes Ag-Ag Cl de la MIS et de l'électrode de référence relient les pipettes aux bornes d'entrée de l'amplificateur à haute impédance d'entrée (voir § Appareillage).

Avant et après les enregistrements *in vivo* les MIS sont calibrées *in vitro* dans des solutions de Na Cl 0.165 M contenant des concentrations croissantes de l'ion étudié. Des solutions salines contenant 10⁻³, 2. 10⁻³, 3 10⁻³, 4. 10⁻³, 5. 10⁻³ et 10⁻² M K Cl, et 10⁻⁵, 10⁻⁴, 10⁻³ 10⁻² 10⁻¹ M Ca Cl₂ ont été utilisées pour étalonner, respectivement, les K-MIS et les Ca-MIS. Cette étape permet de tester les MIS et d'établir la courbe d'étalonnage et la valeur de sa pente. La valeur théorique de la pente, telle qu'elle est obtenue en appliquant l'équation de NERNST, est de 58 mV, à 23°C, pour une K-MIS; en pratique la pente d'une bonne K-MIS est de 52 mV (Fig 4). Pour les Ca-MIS, la valeur pratique moyenne de la pente est de 30 mV (Fig 5). Par conséquent toute électrode présentant une pente d'étalonnage trop inférieure aux valeurs pratiques moyennes ne sera pas retenue pour les mesures *in vivo*.

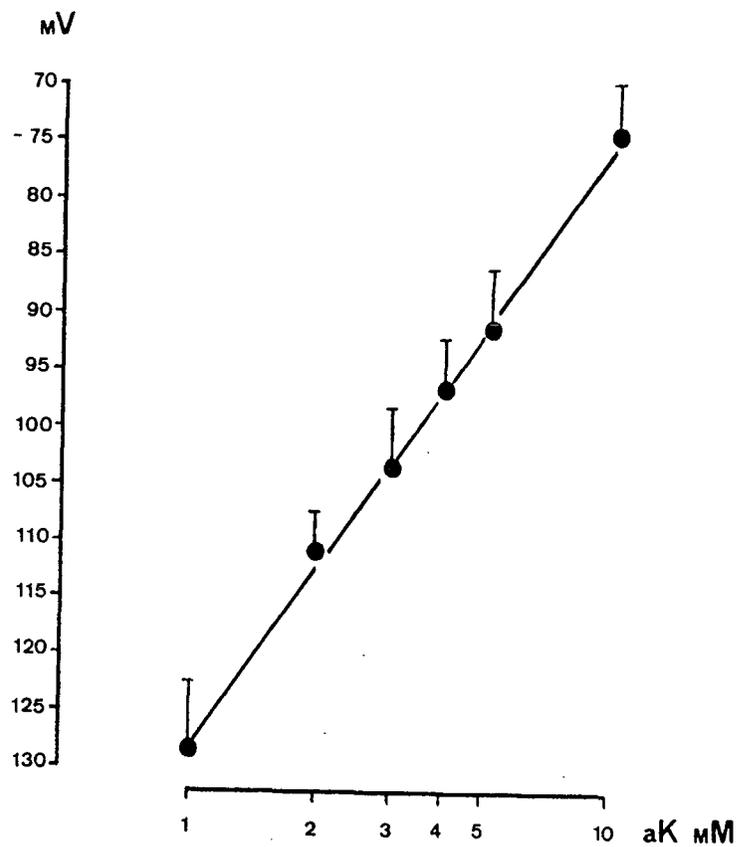


FIGURE 4 :

Courbe d'étalonnage des K-MIS obtenue en calibrant 30 électrodes dans des solutions de Na Cl, 165 mM, contenant différentes concentrations de K Cl. Moyennes \pm E.S.

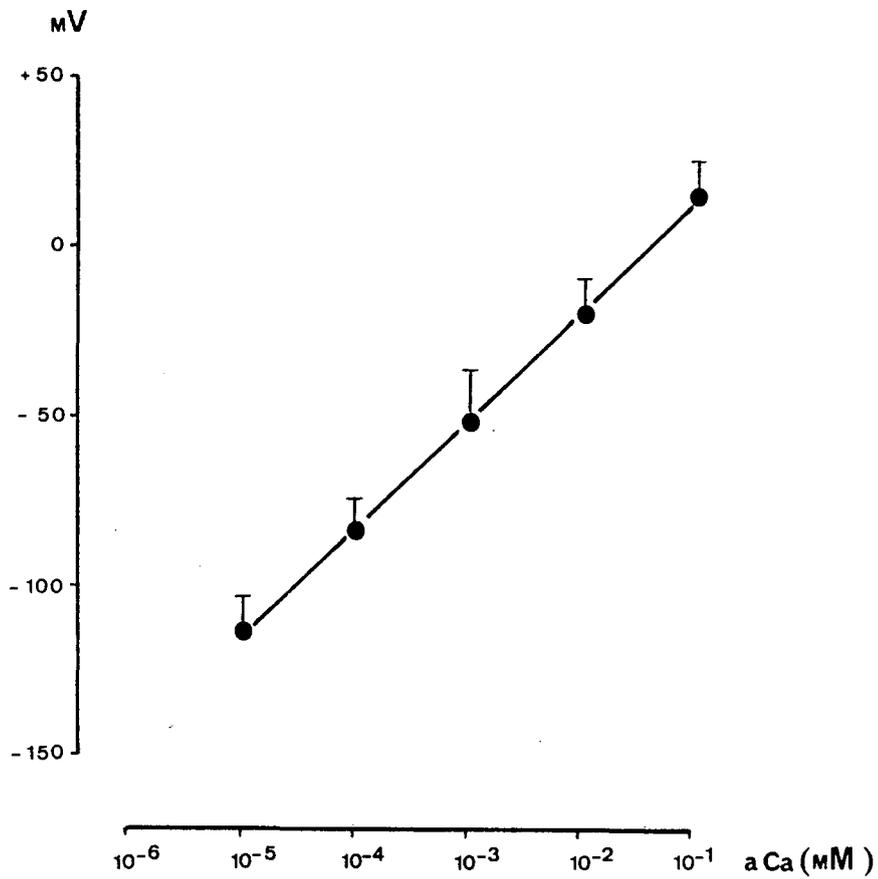


FIGURE 5 :

Courbe d'étalonnage des Ca-MIS obtenue en calibrant 20 électrodes dans des solutions de Na Cl, 165 mM, contenant différentes concentrations de Ca Cl₂. Moyennes \pm E.S.

γ- Caractéristiques opérationnelles d'une K-MIS

La réponse V_x (mV) d'une MIS à une concentration donnée a_x (mM) de l'ion x , est de type NERNST; elle est donnée par l'équation suivante qui découle de l'équation de NIKOLSKII (DJAMGOZ et LAMING, 1981).

$$V_x \text{ (mV)} = S \log a_x + b \quad (1)$$

Dans cette équation S représente la pente de la courbe (mV) et b l'ordonnée de celle-ci à l'origine (mV). La valeur de l'activité de l'ion étudié sera donnée, alors, par :

$$a_x \text{ (mM)} = e \left((V_x - b) / S \right) \quad (2)$$

A partir des courbes d'étalonnage des MIS et grâce à la méthode de la régression linéaire, nous calculons les valeurs respectives de b et de S pour les K-MIS et les Ca-MIS. Les pentes respectives sont :

53.54 mV pour les K-MIS
et 30.50 mV pour les Ca-MIS

Les valeurs respectives de b sont :

7.59 pour les K-MIS
et 60.80 pour les Ca-MIS.

2 - Electrodes de stimulation

Nous utilisons plusieurs sortes d'électrodes de stimulation mono- ou bi-polaires, simples ou multiples. Elles sont fabriquées à partir de fil de tungstène affiné par électrolyse jusqu'à obtention de pointes allant de 20 à 30 μm . Les électrodes sont ensuite isolées à l'aide de plusieurs couches de vernis isolant que nous laissons sécher pendant 2 à 3 heures; seuls les 10 derniers microns de la pointe restent exposés.

Les électrodes de stimulation sont utilisées soit en électrode simple soit en assemblage de 2 ou 3 stimulatrices monopolaires, comme nous l'avons dit plus haut. Dans ce cas, les électrodes sont assemblées, sous contrôle optique, de telle manière que leur pointes soient séparées de 150 à

300 μm . Dans tous les cas de stimulation par électrode(s) monopolaire(s), une électrode de terre, implantée dans la nuque de l'animal est couplée à la stimulatrice et reliée à la borne de sortie de l'unité d'isolement du stimulateur (voir § Appareillage).

3 - Implantation des électrodes

Les électrodes d'enregistrement préalablement calibrées *in vitro*, sont montées sur un micromanipulateur de précision fixé sur la table à stéréotaxie. Elles sont, ensuite, amenées au contact de la surface épithéliale ou bulbaire que les premiers micromètres empalent. Ce point est considéré comme le repère zéro (0 μm), pour la détermination ultérieure de la profondeur de l'assemblage d'électrodes d'enregistrement.

Les électrodes de stimulation sont, quant à elles, positionnées à la surface du bulbe à environ 1 mm de distance des électrodes d'enregistrement. Dans cette position (rostralement par rapport aux microélectrodes d'enregistrement) elles peuvent stimuler orthodromiquement plusieurs faisceaux de fibres convergeant vers le point d'enregistrement.

4 - Appareillage

a - Stimulations

⋄- Olfactométrie

Les stimulations de l'épithélium olfactif sont effectuées en appliquant des odeurs de butanol à l'aide d'un olfactomètre conçu au laboratoire. Ce dernier est constitué d'une pompe envoyant de l'air (air ambiant) dans une chambre de dilution (10 ml) dans laquelle nous plaçons un tampon imbibé de butanol (iso-butanol, MERCK) dilué (1/100 dans l'eau). La chambre est reliée à un rotamètre contrôlant le débit (0.3 à 0.5 ml / sec.), à un cathéter de 0.5 mm de diamètre dont la pointe biseautée est placée à l'aplomb de la cavité olfactive à 5mm de l'épithélium olfactif et enfin, à une trompe à vide qui aspire en permanence l'air contenu dans le cathéter. Le temps d'application de l'odeur est préselectionné grâce à une électrovanne placée après la trompe à vide. Pendant le pulse odorant la

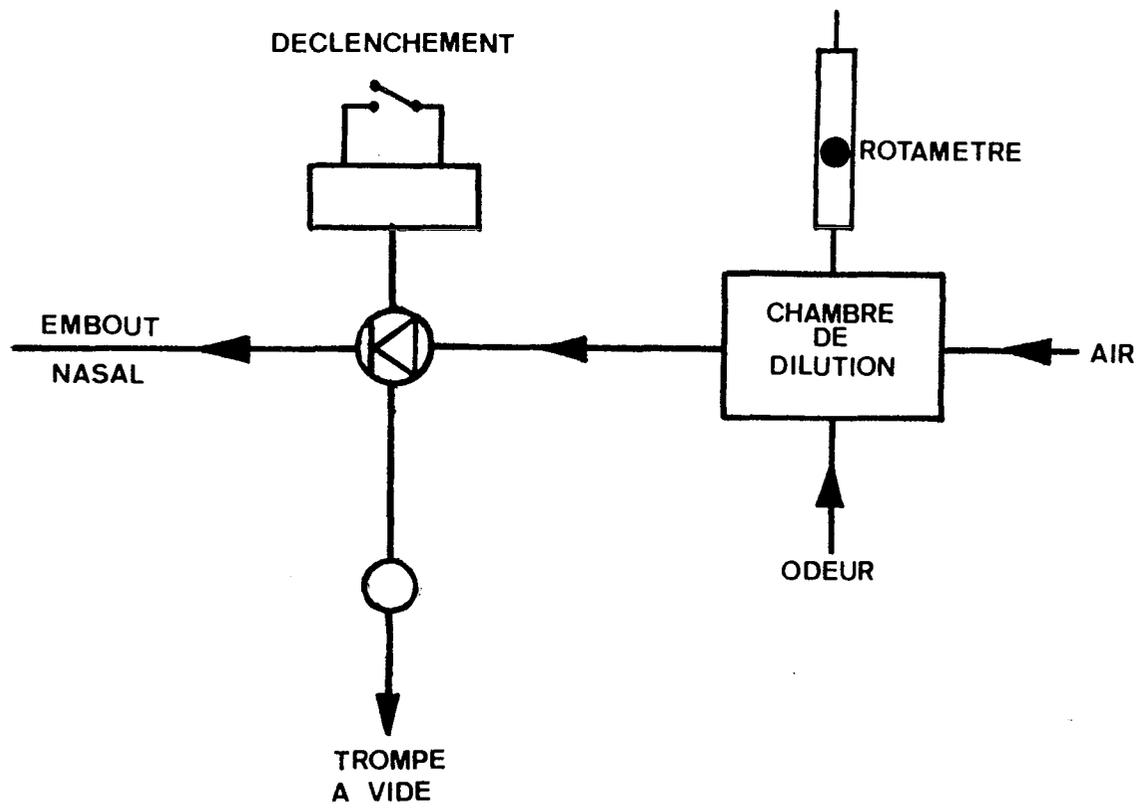


FIGURE 6:
Schéma du montage expérimental utilisé en olfactométrie.

trompe à vide est coupée ce qui permet aux odeurs d'atteindre la surface épithéliale; entre les pulses, le cathéter est purgé grâce à la reprise de l'aspiration par la trompe à vide (Fig. 6).

β - Stimulation électrique du nerf olfactif

Les stimulations des voies afférentes bulbaires sont délivrées par un stimulateur (SOMASTIL, ALVAR) relié à une unité d'isolement placée près de la préparation vivante. Les pulses sont rectangulaires et durent 0.1 msec., l'intensité de stimulation varie entre 1 et 8 V., la fréquence varie, quant à elle, entre 10 et 50 Hz. La durée totale de sollicitation des fibres du N.O. s'échelonne entre 20 et 60 Sec. Les paramètres de stimulation étant variables d'une série de tests à l'autre, ils seront indiqués dans la légende des figures.

b - Enregistrement

Les électrodes d'enregistrement (MIS et référence(s)) sont reliées à l'aide de fils d'argent chlorurés (électrodes Ag-Ag Cl) aux bornes d'entrée d'un amplificateur différentiel (GRASS, P 16 B) de haute impédance d'entrée (110 G Ω); cette impédance étant augmentée par l'emploi d'une sonde placée en série entre les électrodes et l'amplificateur; elle est ainsi ramenée à 150 G Ω .

Les bornes de sortie DC sont utilisées pour enregistrer sur table traçante le signal relatif à l'activité ionique. Les bornes de sortie AC sont utilisées pour recueillir les signaux relatifs à l'activité neuronale globale; elles sont reliées à un oscilloscope (TELEQUIPMENT DM 64) en passant par un échantillonneur (PHYSICAL DATA, 513 A) ce qui nous permet de suivre l'évolution de l'activité électrique bulbaire, et à un enregistreur magnétique permettant de "sonoriser" les décharges recueillies et d'analyser ultérieurement les enregistrements. Un analyseur (SOLARTRON, SM 1860) est utilisé pour l'intégration et le comptage des potentiels enregistrés sur la bande magnétique.

Dans le cas d'enregistrements simultanés, nous utilisons un second amplificateur dont les caractéristiques sont identiques à celles du premier.

Pour les expériences d'olfactométrie, une électrode simple contenant du Na Cl 0.165 M, implantée dans le mucus recouvrant l'épithélium, est reliée à une des bornes d'entrée du second amplificateur, la seconde borne est

reliée à un fil d'argent chloruré placé dans la cavité buccale de la grenouille qui sert de référence pour l'électrode Na Cl. Ce montage nous permet de recueillir l'électroolfactogramme parallèlement à l'activité ionique mesurée par le premier amplificateur.

Un montage comprenant deux amplificateurs est également utilisé pour l'enregistrement simultané des activités potassique et calcique.

c - Iontophorèse.

Les micropipettes d'iontophorèse sont reliées à un générateur d'iontophorèse (WORLD PRECISION INSTRUMENTS, 160) par deux électrodes Ag-Ag Cl plongeant dans les solutions de remplissage des micropipettes. Une des électrodes plonge dans une solution de Na Cl 0.165 M et l'autre dans la solution à éjecter qui est, le cas échéant, ionisée par acidification du pH de la solution. L'ionisation des solutions permet, par application d'un courant d'éjection, de créer un champ électrique dans la pipette qui aura pour effet un déplacement hors de la pipette de quelques molécules de la substance à éjecter; le déplacement des molécules étant proportionnel à l'intensité du courant appliqué dans la gamme allant de 0 à 1000 nA. Un autre courant, appelé courant de rétention (10 nA) est appliqué à l'électrode contenant la solution de Na Cl ce qui freine la diffusion de la substance chargée depuis la pipette en dehors des temps d'application. Le courant de rétention s'engouffre dans la pipette d'éjection à contre-sens ce qui permet de repousser les molécules de substance vers l'intérieur de la pipette.

A l'aide d'un micromanipulateur fabriqué au laboratoire (MATH, 1984), la pointe de la pipette d'iontophorèse est amenée, sous contrôle optique, le plus près possible de la pointe de la MIS. Quand les pointes sont séparées de 6 à 10 μm , les électrodes sont accolées à l'aide d'une résine à polymérisation rapide (résine dentaire); l'écartement de 6 à 10 μm est à respecter pour que l'éjection se fasse le plus près de l'électrode de mesure pour une réponse immédiate et suffisamment loin pour minimiser l'importance des courants faradiques se dirigeant vers la pointe de l'électrode de lecture. Le fait que la pointe de la pipette d'iontophorèse soit placée dans le voisinage de l'électrode de mesure rend la réponse de celle-ci quasiment immédiate. A titre d'exemple, la réponse d'une K-MIS à l'application iontophorétique de potassium à partir d'une source placée à 10 μm , est de 0.1 à 0.2 sec.

Pour NICHOLSON *et al* (1979), la diffusion du type FICK ne peut à elle seule expliquer la migration de potassium dans le cerveau du fait que les ions potassium empruntent, selon toute vraisemblance, des voies transcellulaires. Par conséquent ces auteurs ont corrigé l'équation de CURTIS *et al* (1960) en y introduisant deux facteurs tenant compte de la complexité du milieu de diffusion; il s'agit :

- d'un facteur représentant la tortuosité (λ) du milieu,
 - et un facteur représentant la fraction volumétrique (α) de ce même milieu.
- En effet dans le cas d'une source émettant des particules à une vitesse constante, l'augmentation de la densité en particules éjectées à un point donné du volume accessible d'un milieu de configuration complexe, sera inversement proportionnelle à la fraction volumétrique au niveau de ce point.

Ainsi l'équation de diffusion est donnée par:

$$\Delta C (r,t) = (Q/4\pi D^* r \alpha) \operatorname{erfc} (r/2\sqrt{D^*t})$$

Dans cette équation :

- D^* = coefficient de diffusion corrigé = D / λ^2
- D = coefficient de diffusion
- λ = tortuosité
- α = fraction volumétrique
- Q = la source = I_n / F
- I = courant appliqué
- n = nombre de transport de l'ion appliqué
- F = constante de Faraday
- r = distance
- t = temps
- erfc = fraction complémentaire sur l'erreur.

Tous les facteurs étant connus, nous avons établi des courbes de diffusion donnant la quantité de K^+ diffusant en fonction du courant d'éjection et de l'éloignement de la source par rapport à l'électrode de

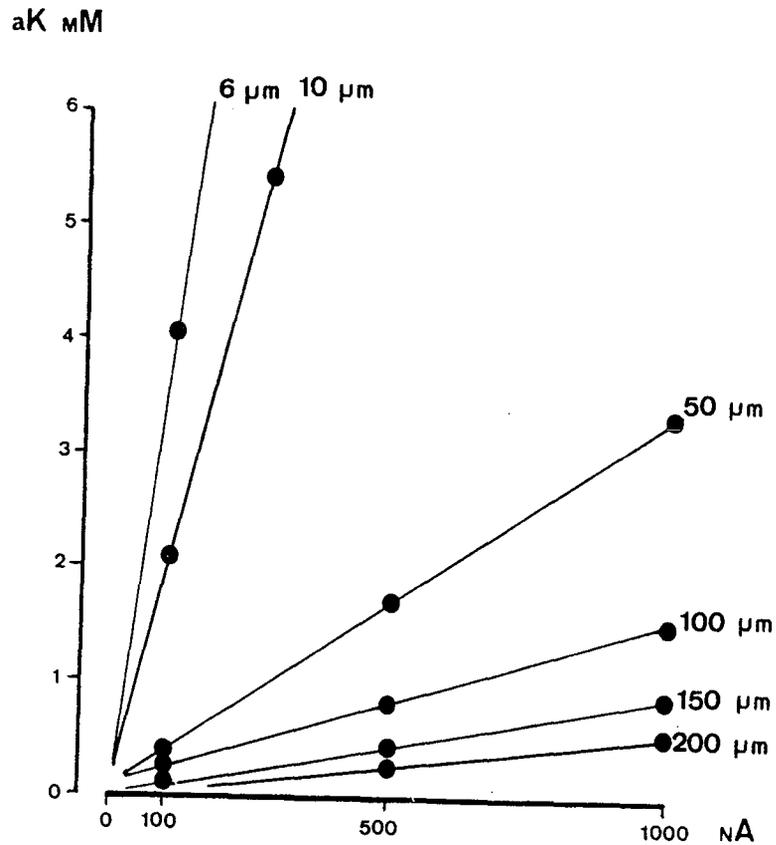


FIGURE 7 :

Courbes donnant la quantité de potassium (mM) libérée par iontophorèse dans le voisinage d'électrodes K-MIS. Les valeurs théoriques moyennes sont données en fonction du courant d'éjection (nA) et de la distance (μm) de la source iontophorétique par rapport à la K-MIS.

lecture (Fig. 7). Concernant la quantité de substances pharmacologiques (neurotransmetteurs, neuromodulateurs) libérée par application iontophorétique, celle-ci dépend du nombre de transport de la substance qui lui-même dépend de plusieurs autres facteurs. READER (1980) a calculé le nombre de transport pour certaines substances en éjectant *in vitro* des analogues radioactifs dans des solutions de Na Cl 0,9%. Il a estimé que les quantités de substances éjectées étaient de l'ordre de 10^{-13} à 10^{-12} M pour des courants d'éjection de 20 à 100 nA appliqués pendant 10 à 30 secondes.

C- METHODES BIOCHIMIQUES

L'étude de l'activité Na,K-ATPase dans le bulbe olfactif a été réalisée *in vitro* sur des homogénats totaux, d'une part et sur des fractions microsomales, d'autre part en collaboration avec M. MESFIOUI (de notre laboratoire). Pour mesurer séparément l'activité enzymatique dans les couches superficielles (couche du nerf olfactif et couche glomérulaire) et la comparer à l'activité mesurée dans le reste du BO, nous avons réalisé un prélèvement des tissus constituant la couche glomérulaire (et la couche du nerf olfactif) du reste du BO. La procédure de prélèvement a été la suivante:

Les rats âgés de 40 jours sont pesés et décapités. Le cerveau antérieur ainsi que les deux BO sont prélevés rapidement au niveau d'une table de prélèvement réfrigérée à +4 °C et stockés à -18 °C pendant 30 minutes pour durcir les tissus nerveux et faciliter leur pelage. L'isolement des couches superficielles a été réalisé en "pelant" la surface bulbaire à l'aide d'une lame acérée et refroidie. Les tissus récupérés à partir de 12 BO et représentant la fraction superficielle d'un poids total de 50 mg, sont homogénéisés à l'aide d'un POTTER dans 4 ml de solution de saccharose 0.25 M. Les tissus restants, dont nous ne gardons que 100 mg, sont homogénéisés, à leur tour, dans 8 ml de saccharose.

En plus des homogénats totaux, nous avons préparé des fractions microsomales à partir des fractions superficielle et profonde issues de 20 BO. Quatre vingt mg de tissus provenant de la fraction superficielle sont homogénéisés dans 8 ml de saccharose et centrifugés une première fois à 12.500 g pendant 15 minutes. A l'issue de cette centrifugation, le culot est remis en suspension dans 4 ml de saccharose et centrifugé à 12.500 g pendant 15 minutes. Le culot de cette deuxième centrifugation est éliminé et le surnageant ajouté à celui de la première centrifugation et le tout est centrifugé

une dernière fois à 100.000 g pendant 60 minutes. Le surnageant est éliminé et le culot (fraction enrichie en microsomes) est suspendu dans 9 ml de saccharose. Cette dilution nous a permis d'avoir une concentration finale en protéines approchant celle de l'homogénat total.

Dans les deux cas (homogénats totaux et fractions microsomales), les tubes sont stockés à -18 °C pendant 24 heures avant l'évaluation biochimique. Celle-ci comporte:

- Une détermination du contenu protéique selon la méthode de LOWRY *et al* (1951).

- Et une détermination *in vitro* de l'activité Na,K-ATPase en mesurant la quantité de phosphore inorganique libérée à partir de l'ATP dans un milieu d'incubation à 37 °C pendant 15 minutes. La technique utilisée est celle de BAGINSKI *et al* (1965). L'activité ATPase dans les différents homogénats est mesurée en présence d'ions Mg⁺⁺, 3 mM; Na⁺, 130 mM; de substrat ATP disodique (Adénosine 5'-triphosphate), 3 mM et de Tris-H Cl, 100 mM, pH 7.4. Pour la détermination de l'activité ATPase de base, nous avons ajouté de l'ouabaine, 1 mM au milieu d'incubation. L'activité ATPase totale a été obtenue en déterminant l'activité enzymatique dans un milieu ne contenant pas d'ouabaine mais renfermant des ions K⁺, 30 mM et Na⁺, 100 mM. L'activité Na,K-ATPase a été obtenue en retranchant l'activité Na,K-ATPase de l'activité ATPase totale.

Nous avons réalisé les déterminations des activités enzymatiques par dosage colorimétrique où l'intensité de la coloration était proportionnelle à la quantité de phosphore libérée dans le milieu d'incubation. La densité optique a été mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre (type ZEISS, PMQ 11) à 700 nm.

Pour nous assurer de la qualité de "pelage" des bulbes olfactifs, d'autres bulbes ont été préparés selon la même procédure mais pelés partiellement pour avoir des points de repères histologiques. Les bulbes sont ensuite, fixés au formol 10 % et découpés à l'aide d'un microtome à congélation en tranches de 50 µm d'épaisseur montées sur lames porte-objets.

D- CONTROLES HISTOLOGIQUES

A la fin des manipulations, les rats sont préparés en vue de la fixation de leur cerveau par une perfusion intracardiaque de formol (10 % dans du Ringer). Au terme de la perfusion, le cerveau et les bulbes olfactifs sont extraits de la boîte crânienne et stockés dans du formol pendant quelques jours. Lavés dans une solution de saccharose (30 %) pendant 24 heures, ils sont ensuite, congelés à - 18°C, montés sur un microtome à congélation (REICHERT) et découpés en tranches de 50 μm d'épaisseur. Les coupes récupérées sont soit colorées à la thionine soit soumises à une imprégnation argentique.

La coloration à la thionine (LANGERON, 1949) est de type nucléaire. Elle fait apparaître par contraste le contour des glomérules ainsi que l'assise des cellules mitrales.

L'imprégnation par les nitrates d'uranyle et d'argent (méthode de NAUTA-GIGAX modifiée par FINK et HEIMER, 1967) est de type fibrillaire faisant apparaître les fibres nerveuses colorées en brun.

Les coupes nous permettent de vérifier la position des électrodes d'enregistrement par rapport aux couches bulbaires. Le dépôt de colorant (Fast Green) pendant l'expérimentation, permet de localiser avec précision la position des électrodes pendant l'enregistrement.

Dans le cas des bulbes olfactifs partiellement "pelés" (étude biochimique), ces contrôles histologiques nous ont permis de nous assurer de la qualité du "pelage" des bulbes et de l'absence de contamination des échantillons tissulaires par les couches profondes (voir § C - Méthodes Biochimiques).

III- CALCULS ET TESTS STATISTIQUES

Le principal test comparatif utilisé est le test de MANN et WHITNEY. Ce test non-paramétrique permet de comparer deux séries de valeurs (n_1 et n_2) et de conclure quant à l'appartenance ou non des deux séries à la même population. Il consiste en un classement en ordre croissant des valeurs constituant les séries à comparer; chaque valeur reçoit un numéro d'ordre. Le U de MANN et WHITNEY représentera la somme des nombres de fois qu'une valeur de la deuxième série précédera une valeur de la

première. En nous servant de tables statistiques, nous pouvons pour chaque valeur de U déterminer la significativité de la comparaison.

Ces calculs de significativité ont été réalisés sur microordinateur dans le laboratoire de Biologie du Comportement dirigé par le Professeur KRAFFT.

RESULTATS ET DISCUSSION

1 ère PARTIE
VARIATIONS DU METABOLISME MINERAL
DANS L'EPITHELIUM OLFACTIF DE GRENOUILLE

I- RESULTATS

La stimulation de l'épithélium olfactif par une odeur provoque l'apparition d'un électroolfactogramme (EOG) dont l'amplitude dépend de l'intensité de la stimulation et de la nature de la substance odorante. Notre choix de substance odorante s'est porté sur le butanol car ce composé active un large éventail de récepteurs (HOLLEY et MAC LEOD, 1977), passe rapidement en solution dans le mucus (HORNUNG *et al*, 1987) et sa durée d'application est pratiquement limitée à celle du flux odorant en raison de sa très grande volatilité. Les concentrations utilisées ont été calculées à partir de la molarité de la vapeur saturée en butanol qui est de $3,76.10^{-4}$ (GESTELAND *et al*, 1982). Le jet d'air odorant variait de 0,3 à 0,5 ml/sec.

Dans le présent chapitre nous allons examiner les relations susceptibles d'exister entre la formation de l'EOG et les mouvements de certains ions, en l'occurrence les ions K^+ et Ca^{++} , dans l'épithélium olfactif.

A - MOUVEMENTS POTASSIQUES

1- Dans le mucus

Quand l'électrode K-MIS est positionnée dans le mucus à quelques dizaines de microns de l'électrode enregistrant l'EOG, elle détecte une activité potassique de 3.7 ± 0.5 mM (n = 25). Cette valeur ne fluctue pas de manière significative quand la K-MIS est déplacée à la surface du mucus ou dans l'assise épithéliale.

L'application d'un stimulus odorant (butanol, 6 sec.) provoque d'une part, l'apparition d'un EOG dont l'amplitude moyenne est de 5 mV et d'autre part, une élévation de aK de 4.1 ± 0.3 mM (Fig. 8, A.).

L'examen du décours des tracés de ces deux réponses montre que la variation de aK n'atteint sa valeur maximale que 3 à 4 secondes après la fin de la première phase (phase de dépolarisation) de l'EOG qui dure 2 secondes en moyenne. Par ailleurs, le retour à aKo se fait plus lentement que le rétablissement du potentiel transépithélial de repos (35 à 40 sec. contre 10 sec. après la fin du pulse).

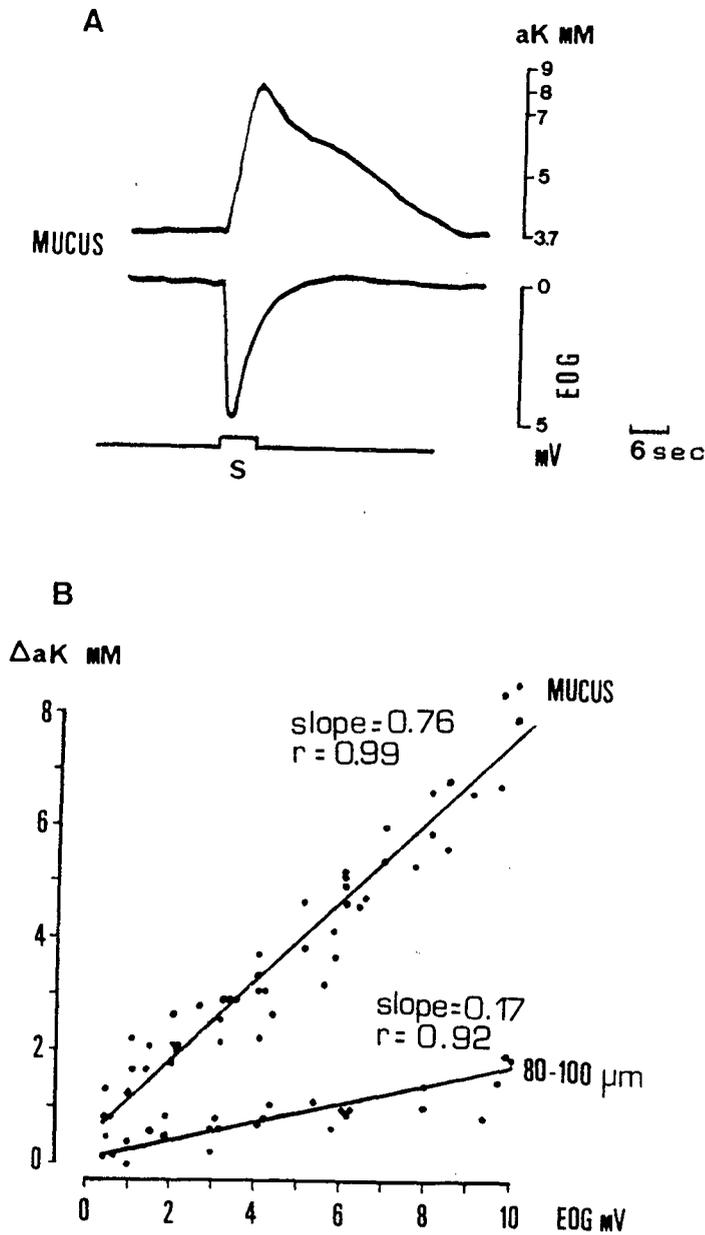


FIGURE 8:

A : Variation de aK en réponse à un pulse de butanol (6 sec) induisant la formation d'un EOG de 5 mV.

S : stimulation

B : Corrélation entre EOG (enregistrés dans le mucus) et les variations de l'activité potassique (ΔaK , mM) dans le mucus (courbe de haut) et dans l'assise épithéliale (courbe du bas).

Chaque point représente une réponse individuelle.

Les pentes des droites (slope) et les coefficients de corrélation (r) ont été calculés par la méthode de la régression linéaire.

La variation de l'intensité du stimulus montre qu'il existe une relation de proportionnalité entre l'amplitude de l'EOG et celle de la variation de aK (Fig 8, B). Il faut, cependant, noter que le temps de retour à aKo est d'autant plus long que la stimulation est intense.

Lorsque le stimulus est présenté de manière répétitive (stimuli de 5 sec. séparés d'intervalles allant de 15 à 3 sec., Fig 9) nous observons un phénomène d'adaptation aussi bien de l'EOG que de la réponse K. Cette adaptation se manifeste sous forme d'une baisse de l'amplitude des deux réponses. Cependant, nous assistons à un cumul des réponses K de sorte que le niveau de K croît progressivement mais moins fortement que si chaque réponse K était additionnée à la précédente. Ensuite, la variation totale de aK présente un plateau puis décroît en même temps que nous observons une diminution de l'amplitude de l'EOG jusqu'à 1/3 de la valeur initiale à la 20ème présentation de l'odeur (Fig.9). Ce résultat confirme l'existence d'un phénomène d'adaptation des neurorécepteurs aux stimulations répétitives (GESTELAND *et al*, 1982).

2-Dans l'assise épithéliale

Nous avons descendu la K-MIS dans l'assise épithéliale par pas de 20 μm et enregistré la réponse K à différentes profondeurs pour un EOG constant; l'électrode donnant l'EOG demeurant toujours en surface car l'amplitude de l'EOG chute considérablement en profondeur (MOULTON et BEIDLER, 1976).

Nous pouvons voir sur la figure 10 que les réponses potassiques changent d'allure en fonction de la profondeur de la façon suivante :

- Sur une course de $40 \pm 10 \mu\text{m}$ de la K-MIS, les réponses diminuent légèrement en amplitude (8 à 10 %) mais ne changent pas d'allure.

- Ensuite, la réponse K devient moins rapide et son amplitude diminue de manière progressive jusqu'à s'annuler en profondeur (Fig. 10, b). Ainsi, pour un même EOG (6 mV) la réponse est de 5 mM dans le mucus, de 1,5 mM à -50-60 μm et de 0,6 mM à -80 μm . A -120-140 μm la réponse devient difficilement décelable car la K-MIS quitte certainement l'assise épithéliale pour s'engager dans la sous-muqueuse (cf Fig. 10) . De plus, les temps nécessaires pour que la réponse soit maximale et pour qu'elle retourne à aKo s'allongent en profondeur, surtout si la stimulation est intense (Fig. 10,a.)

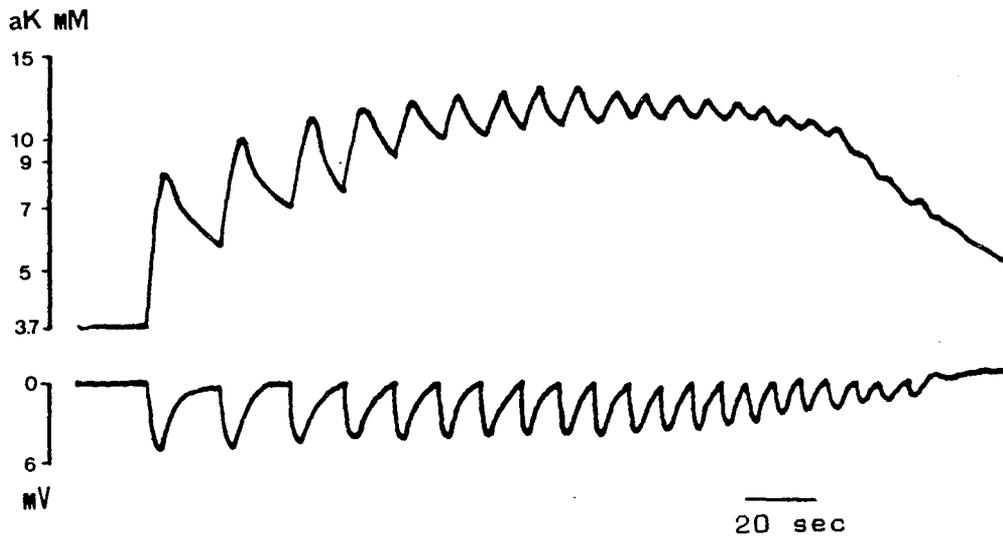


FIGURE 9 :

Exemple de cumul des réponses potassiques apparaissant lors de la stimulation répétitive de l'épithélium par des pulses (5sec) de plus en plus rapprochés.

Les réponses potassiques présentent une phase de cumul des variations de aK suivie d'une phase en plateau puis d'une décroissance de l'amplitude des réponses individuelles et de la réponse totale. La décroissance affecte également l'EOG qui ne représente plus que 1/3 de l'EOG initial à la 20ème présentation du stimulus.

Barre horizontale : 20 sec.

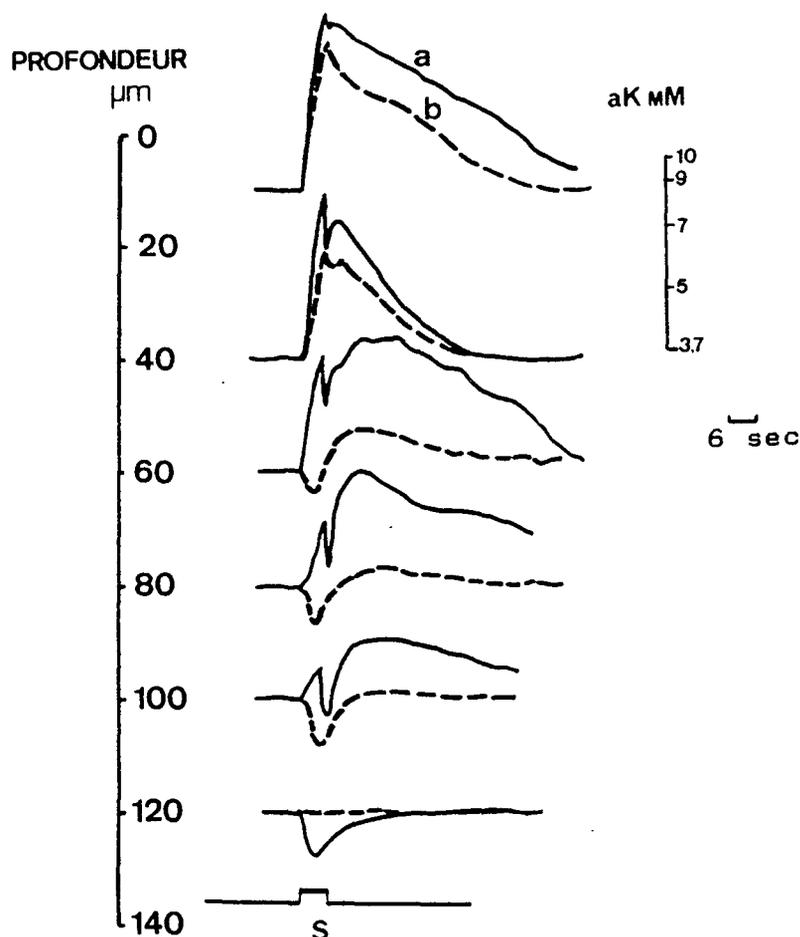


FIGURE 10 :

- Variations de l'activité potassique extracellulaire (aK, mM) en réponse à une bouffée (S) de butanol (6 sec) enregistrées à différentes profondeurs de la préparation.

a- Réponses à une stimulation intense (flux odorant : 0.5 ml/sec; EOG : 6 mV).

Deux variations de aK sont observées au niveau de l'interface mucus/épithélium et dans l'épithélium. A la base de l'épithélium, ces deux réponses disparaissent pendant qu'apparaît une baisse de aK à -120 μm.

b- Réponses apparaissant avec un EOG de 4 mV (flux odorant : 0.3 ml/sec) Une seule élévation de aK est observée; en profondeur, elle est précédée d'une baisse de aK. A la base de l'épithélium, ces deux réponses disparaissent.

- En profondeur, l'élévation de aK est précédée d'une diminution de faible amplitude de aK (0.3 ± 0.15 mM, $n = 15$) entre - 60 et -100 μm pour des stimulations de moyenne intensité (Fig. 10,b). Il faut noter que pour une stimulation intense (Fig. 10,a) cette phase de décroissance de aK n'est bien visible qu'à la base de l'épithélium car elle est masquée plus haut par la phase d'élévation de aK. Cette phase pendant laquelle aK diminue retarde donc, l'apparition de l'élévation de aK; ce retard peut aller de 10 à 20 sec. De ce fait, l'augmentation de aK n'est maximale que plusieurs secondes après la fin de la stimulation odorante.

- Enfin, les réponses aux stimulations intenses présentent deux phases d'élévation de aK. En effet, la première élévation est suivie d'une légère déviation négative puis d'une élévation de type "off". Dans le mucus, l'amplitude de la réponse "off" est sensiblement inférieure à celle de la première variation; dans l'assise épithéliale, elle est plus ample entre - 60 et - 100 μm et s'annule plus bas (Fig. 10) .

3- Application de K^{\pm} exogène

Nous avons voulu savoir s'il existait une relation de cause à effet entre les mouvements potassiques dans l'épithélium et la formation de l'EOG. Pour ce faire, nous avons procédé à l'application iontophorétique de K exogène dans l'épithélium et enregistré les variations potassiques à différentes profondeurs.

L'application de 100 nA de K produit une déviation de aK correspondant à celle obtenue lors de la formation d'un EOG de 5 à 6 mV c'est à dire une variation de l'ordre de 4 mM (Fig. 11,A.). Cependant, l'application a peu ou pas d'effets sur la formation de l'EOG; en effet, le K exogène ne provoque que dans quelques rares cas l'apparition d'une petite onde positive dont l'amplitude n'excède pas 1 mV.

En ce qui concerne la diffusion du K dans l'épithélium, celle-ci semble suivre les lois de diffusion définies par CURTIS *et al* (1960) et NICHOLSON *et al* (1979) et ce malgré l'existence de différences structurales entre les milieux où diffuse le K à savoir le mucus de surface, le mucus profond et l'assise épithéliale qui présente, de surcroît, des jonctions intercellulaires (cf. INTRODUCTION). L'élévation de aK produite par l'application de K (100 nA) atteint ainsi son maximum au niveau de la couche superficielle de mucus, c'est à dire près de la pipette d'éjection du K

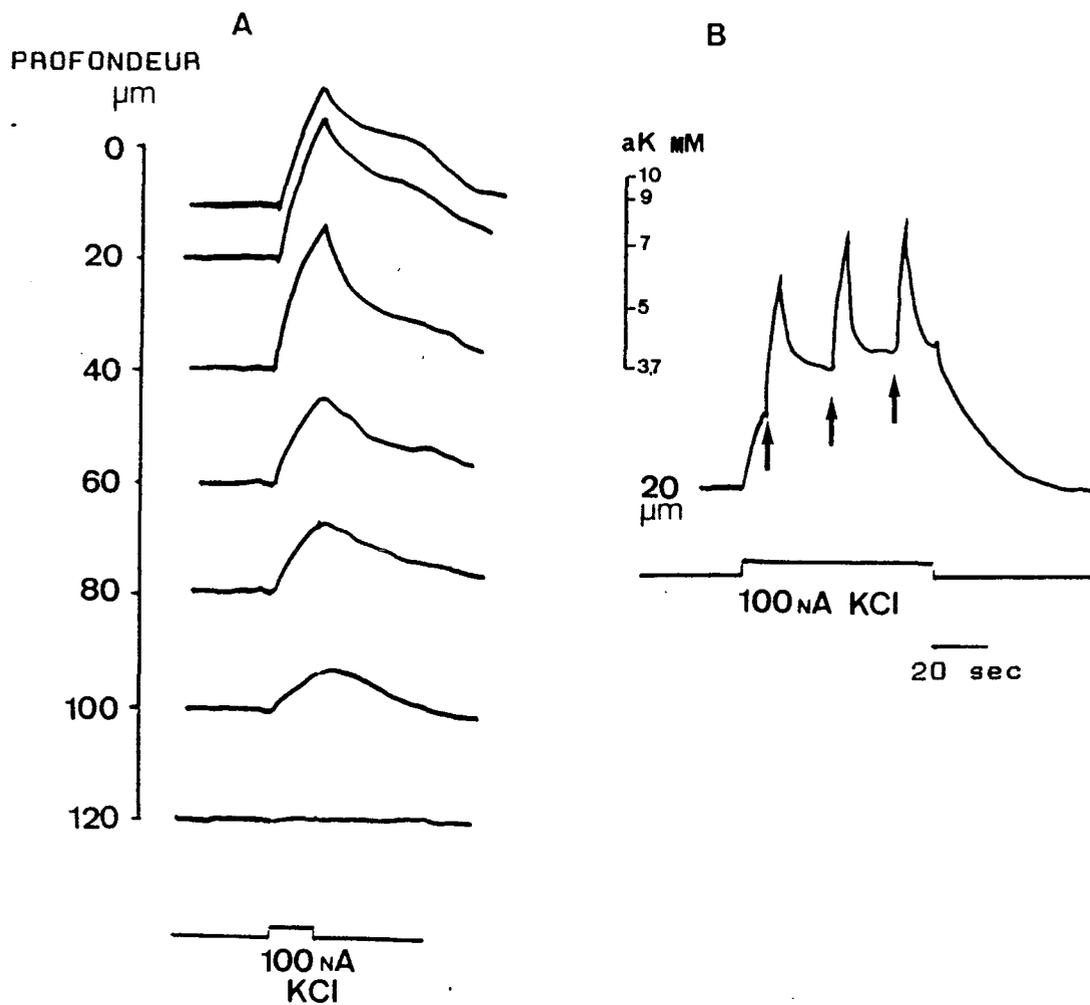


FIGURE 11 :

A : Influence de l'application iontophorétique de K Cl (100 nA) dans le mucus sur aK enregistrée à différentes profondeurs de la préparation.

Durée du pulse : 6 sec.

B ; Influence de l'application de K Cl (60 à 70 sec) sur la réponse potassique provoquée par des pulses de butanol (flèches). L'augmentation artificielle de aK ne modifie pas la réponse à l'odeur.

Durée des pulses odorants : 4 sec.

Barre horizontale : 20 sec.

logée dans les 10 μm superficiels de mucus. L'amplitude de la réponse K décroît proportionnellement à la profondeur et s'annule à la base de l'épithélium (Fig. 11,A.). Par ailleurs, l'application prolongée de K durant 60 à 70 sec. n'affecte nullement les réponses potassiques à l'application de pulses odorants (Fig. 11,B).

4- Application d'ouabaïne

Nous avons procédé à l'application iontophorétique d'ouabaïne (un bloqueur spécifique de l'activité Na,K-ATPasique) dans l'épithélium pour tenter d'expliquer l'apparition de la phase de baisse de aK en profondeur en réponse à l'application d'odeurs de butanol. L'application d'ouabaïne à -60 μm (80 nA) quelques secondes avant le début de la stimulation odorante provoque, en profondeur, une disparition de l'onde négative et un allongement de l'onde positive "off" dont elle augmente sensiblement l'amplitude (Fig. 12,A).

5 - Application de cobalt

L'application iontophorétique de cobalt dans le mucus provoque une réduction dose-dépendante de l'amplitude de la variation de aK induite par le butanol. Cependant, des courants très élevés (200 à 300 nA) sont nécessaires pour provoquer la disparition totale de la réponse potassique (Fig. 12,B).

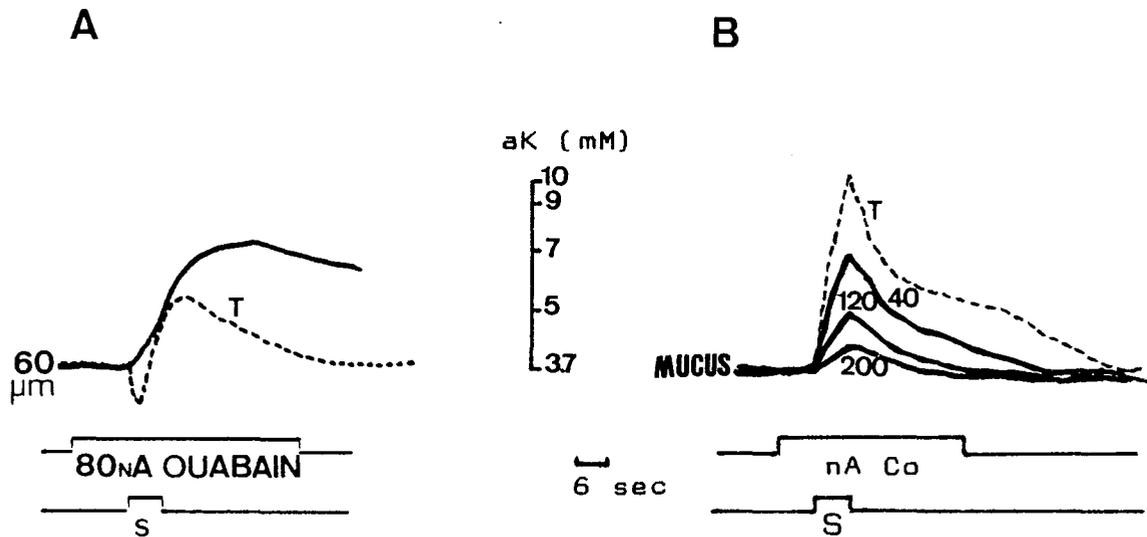


FIGURE 12 :

A- Influence de l'application d'ouabaïne sur les réponses potassiques profondes. A $-60 \mu\text{m}$, la réponse témoin est biphasique (T, trait discontinu); elle est modifiée par l'application d'ouabaïne (80 nA) qui provoque une disparition de l'onde négative et une augmentation de l'amplitude et de la durée de l'onde positive.

B- Influence de l'application de cobalt ($40\text{-}200 \text{ nA}$) sur la réponse potassique enregistrée dans le mucus. La diminution de l'amplitude de la réponse est proportionnelle à la dose de cobalt appliquée.
Durée du pulse odorant : 6 sec . Durée de l'application de l'ouabaïne et du cobalt: 40 sec .

B - MOUVEMENTS CALCIQUES

Contrairement à l'activité potassique, la détermination de l'activité calcique de base (a_{Ca0}) montre que a_{Ca0} est largement supérieure dans le mucus à celle mesurée dans l'assise épithéliale. Ainsi, a_{Ca0} dans le mucus est de 3.2 ± 0.7 mM ($n = 20$) et chute brutalement à 0.8 ± 0.2 mM quand la Ca-MIS est positionnée à une profondeur allant de -50 à -60 μm , ensuite, elle se stabilise dans le reste de l'épithélium à 1.1 ± 0.3 mM (Fig. 13.)

L'application de stimuli odorants (pulses de butanol de 6 sec. de durée) provoque des fluctuations de a_{Ca} dont la nature et l'amplitude dépendent de l'intensité de la stimulation et de la profondeur de la Ca-MIS.

1- Dans le mucus

Nous avons présélectionné deux intensités de stimulation produisant des EOG de 4 et 6 mV. La figure 14 montre les variations de a_{Ca} enregistrées dans le mucus en réponse à ces deux stimulations.

L'apparition d'un EOG de 4 mV, par exemple, s'accompagne d'une variation de a_{Ca} en deux temps. Nous assistons, d'abord, à une baisse de a_{Ca} dont l'amplitude est de 1.1 ± 0.1 mM ($n = 10$) et dont la durée est de 5 à 6 sec. Cette réponse disparaît pour un EOG ≥ 6 mV (Fig. 14.).

Il faut noter que la chute de a_{Ca} , quand elle a lieu, est contemporaine de la première phase (phase de dépolarisation) de l'EOG. Ensuite, nous observons un retour à a_{Ca0} qui est contemporain de la phase de repolarisation rapide de l'EOG.

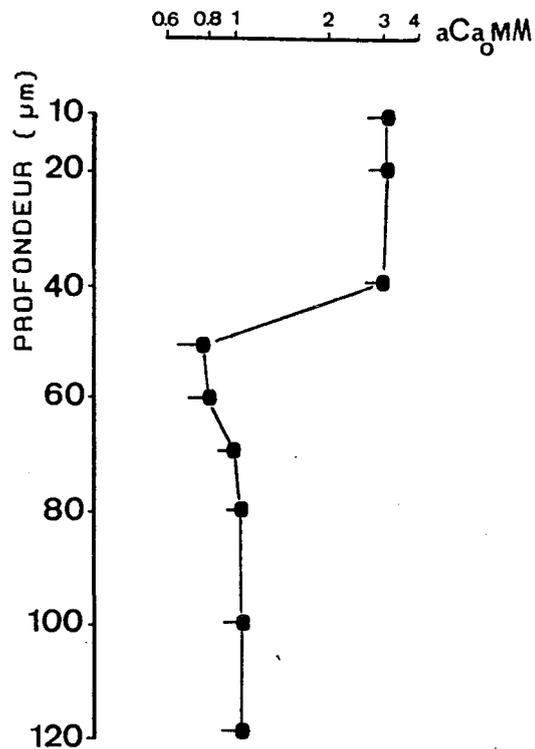


FIGURE 13 :

Valeurs de l'activité calcique de base (aCao, mM) à différentes profondeurs de la préparation.

Les points représentent les moyennes \pm E.S. (n = 20).

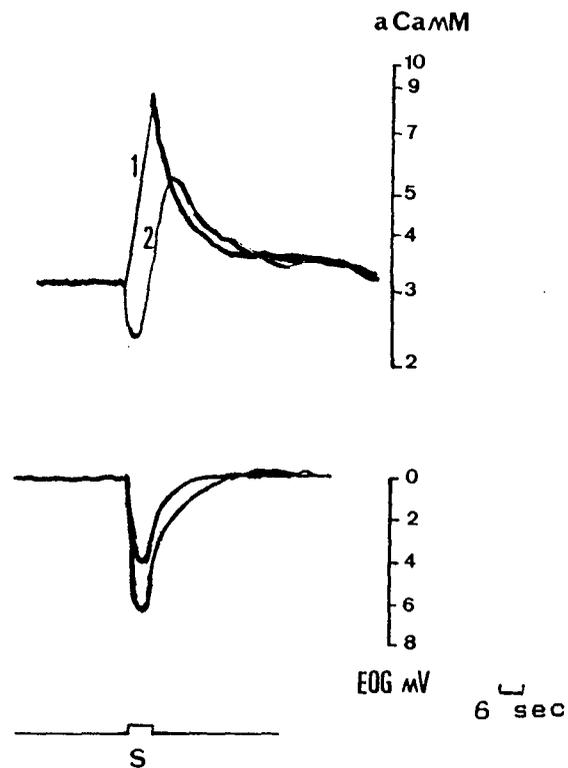


FIGURE 14 :

Tracés des variations de aCa (mM) enregistrées dans le mucus en réponse à deux stimuli (S) d'intensités différentes.

L'amplitude de l'EOG est:

1 : 6 mV ; 2 : 4 mV

Enfin, nous enregistrons une phase d'élévation de aCa dont l'amplitude est de 1.7 ± 0.3 mM ($n = 10$) pour un EOG de 4 mV.

Quand la stimulation est plus intense (EOG : 6 mV) la réponse aCa change d'allure; elle consiste, alors, en une seule phase d'élévation de aCa sans qu'aucune chute préalable de celle-ci ne soit décelable. L'amplitude de l'élévation de aCa est plus importante que dans le cas précédent (5.9 ± 0.5 mM, $n = 14$).

Dans tous les cas, le retour final à aCao marque une phase en forme de plateau (cf. Fig. 15, astérisque) avant de se stabiliser à aCao.

2- Dans l'assise épithéliale

A mesure que la Ca-MIS s'enfonce dans l'assise épithéliale les allures des réponses aux stimulations odorantes, qu'elles soient de faible ou de forte intensité, deviennent semblables (Fig. 15.).

A $-50 \mu\text{m}$, c'est à dire au niveau de l'interface mucus-épithélium, nous voyons réapparaître la phase de baisse de aCa pour les stimulations produisant un EOG ≥ 6 mV ainsi qu'une diminution de l'amplitude de la phase d'élévation de aCa; cette diminution étant plus marquée pour les réponses à des stimulations de moyenne intensité (EOG de 4 mV, Fig. 15, b.).

A $-80 \mu\text{m}$, la phase de chute de aCa augmente légèrement en amplitude et la phase d'élévation s'annule pour les stimulations de faible intensité (EOG : 4 mV.). Pour les stimulations intenses (EOG : 6 mV) la première réponse (chute de aCa) se maintient et la seconde (élévation de aCa) diminue en amplitude (Fig. 15, a.).

A $-110 \mu\text{m}$, les réponses sont quasiment identiques pour les stimulations faibles et intenses et consistent uniquement en une baisse de aCa de 0.3 ± 0.1 mM.

3 - Influence des ions cobalt

Pour essayer de déterminer l'origine des flux calciques, notamment la chute de aCa, nous avons procédé à l'application iontophorétique de cobalt dans le mucus et dans l'épithélium pour bloquer les canaux calciques.

L'application de cobalt (20 nA) dans le mucus et dans l'assise épithéliale provoque une réduction (-57 %) de l'amplitude de la baisse de

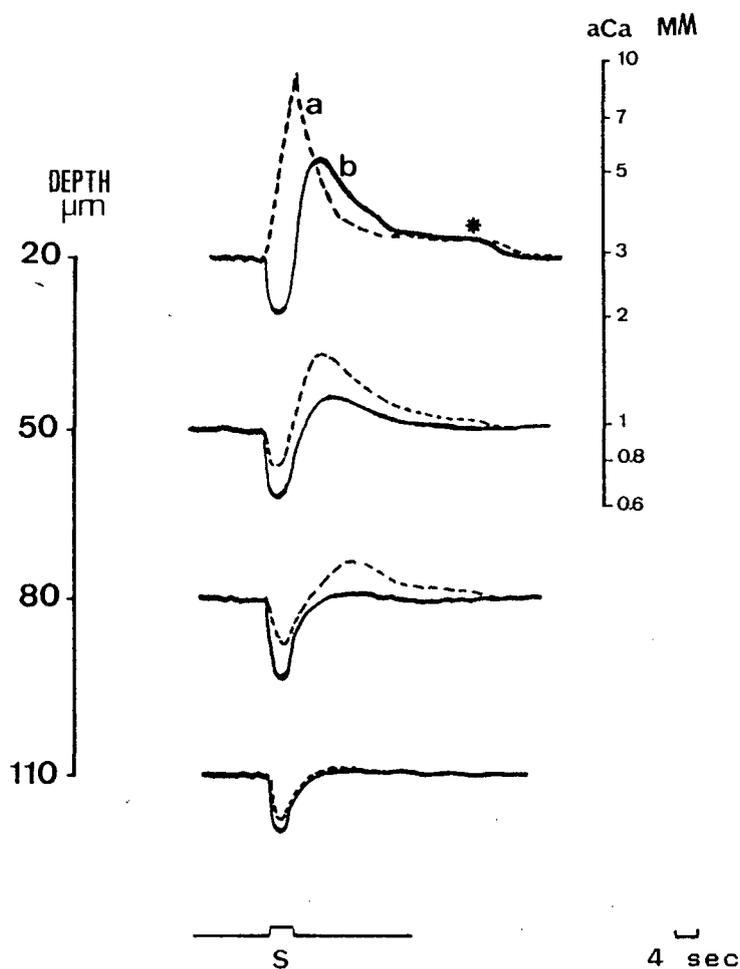


FIGURE 15 :

Variations de aCa (mM) enregistrées à différentes profondeurs de la préparation en réponse à la stimulation (S).

a- EOG : 6 mV (flux odorant : 0.5 ml/sec). La réponse consiste en une élévation de aCa précédée, dans l'assise épithéliale, par une baisse de aCa.

b- EOG : 4 mV (flux : 0.3 ml/sec). La réponse est, d'emblée, composée de deux phases, une de baisse, l'autre d'élévation de aCa; cette dernière diminuant jusqu'à s'annuler en profondeur. Dans le mucus, le retour vers aCao se fait en marquant une phase en plateau ().*

Durée des pulses : 4 sec.

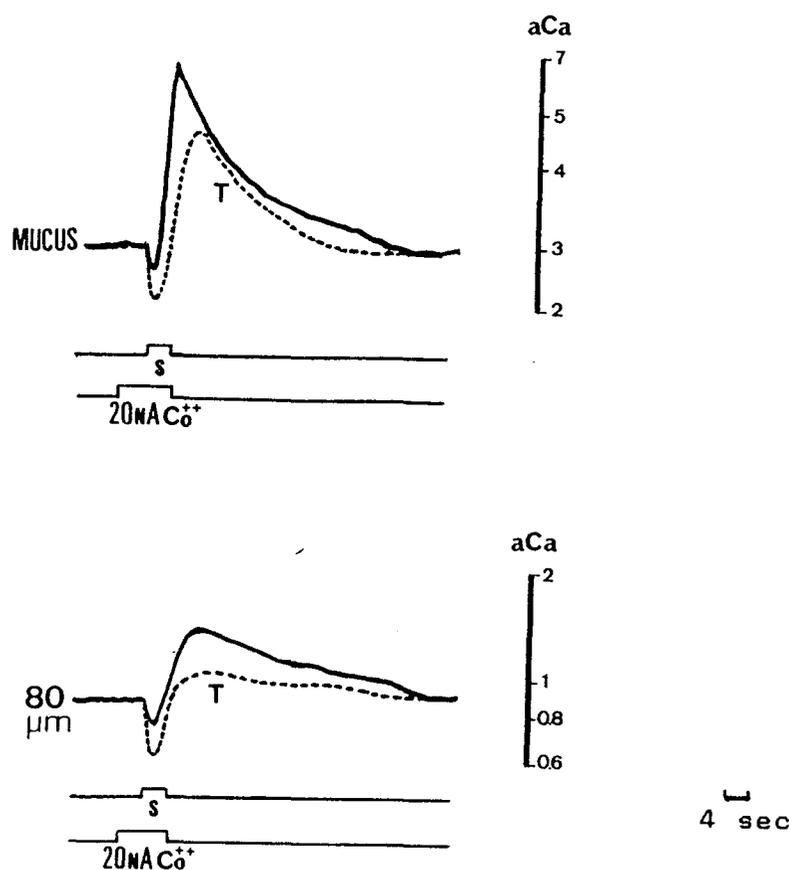


FIGURE 16 :

Influence de l'application iontophorétique de cobalt (20 nA) sur la variation de aCa (mM) provoquée par l'application d'un pulse (S) de butanol (EOG : 6 mV)

Dans le mucus, le cobalt provoque une diminution de l'amplitude de la phase de baisse de aCa et une augmentation de l'amplitude de l'élévation de aCa ainsi qu'un allongement du temps de retour à aCa0.

Dans l'épithélium (-80 μm), les effets du cobalt sont les mêmes que dans le mucus.

Durée du pulse de butanol : 4 sec.

Durée de l'application iontophorétique de cobalt : 9 sec.

Le cobalt est appliqué dans le voisinage de la Ca-MIS.

T : réponse témoin.

aCa (Fig. 16.). L'accroissement de l'intensité du courant d'éjection du cobalt au delà de 150 nA peut provoquer une suppression totale de toute réponse à l'endroit où le cobalt est appliqué mais, à ces doses, le cobalt devient toxique pour les éléments nerveux, rendant aspécifique la réponse au cobalt .

Il faut noter que le cobalt provoque une réduction de l'amplitude de l'EOG (-40 à -50 % pour 20 nA Co) mais celle-ci n'est pas observée systématiquement. Ceci peut être expliqué par le fait que l'application iontophorétique de cobalt n'intéresse qu'une petite zone localisée dans le voisinage de l'électrode d'éjection alors que l'EOG (et les variations de aCa) résultent de l'activation de plusieurs régions de l'épithélium olfactif. De plus, l'existence d'un écartement entre la pipette d'éjection et les électrodes de mesure (voir MATÉRIELS et MÉTHODES) favorise la variabilité des résultats.

Par ailleurs, l'application de cobalt provoque une augmentation (+45 à +60 % pour 20 nA Co) de l'amplitude de la phase d'élévation de aCa ce qui provoque un allongement du temps de retour à aCao (Fig. 16).

4 - Applications de Ca exogène

Comme nous l'avons fait pour le K⁺, nous avons procédé à l'application iontophorétique de Ca dans le mucus afin d'enregistrer la variation de aCa à différentes profondeurs de la préparation.

L'application de Ca Cl₂ est faite à partir d'une pipette d'iontophorèse logée dans le mucus à -10 μm de profondeur.

La déviation de aCa enregistrée par la Ca-MIS se présente sous forme d'une élévation de aCa (Fig. 17). Celle-ci est maximale à 10 μm de profondeur (3.4 ± 0.5 mM, n=10), décroît au fur et à mesure que la Ca-MIS est descendue dans la couche de mucus et s'annule totalement à 50 μm c'est à dire au niveau de l'interface mucus / épithélium (Fig. 17).

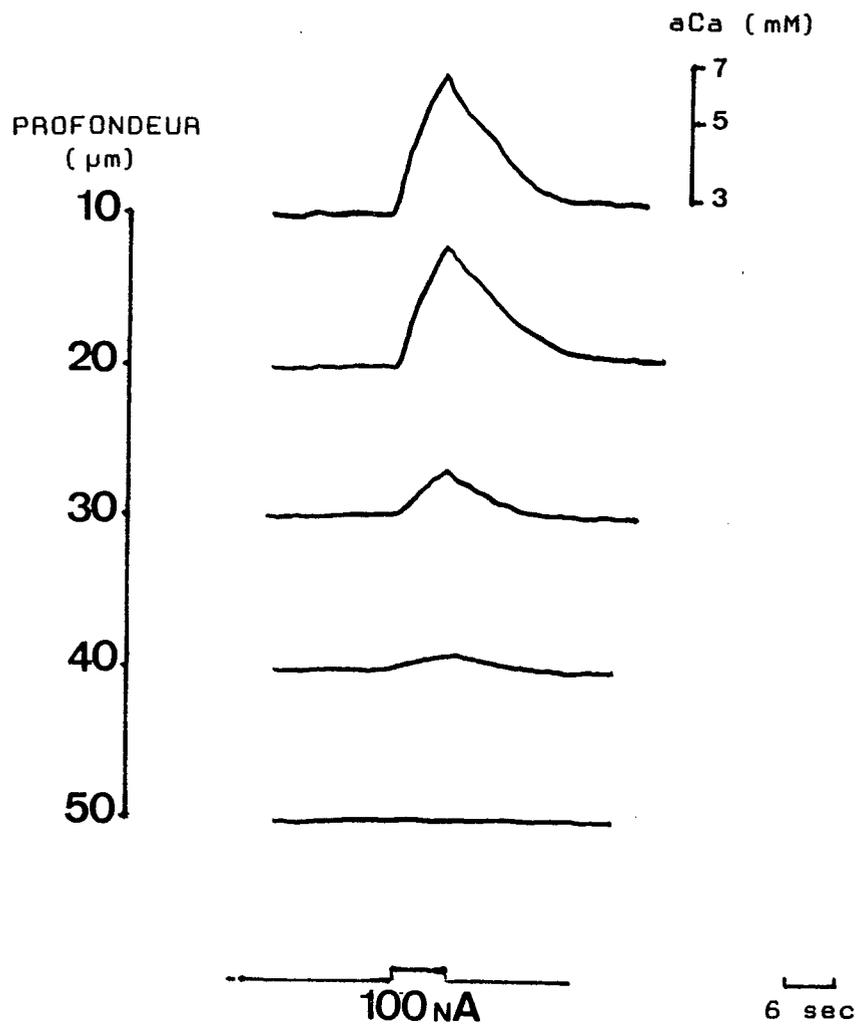


FIGURE 17 :

Influence de l'application iontophorétique de CaCl_2 (100 nA) dans le mucus sur aCa enregistrée à différentes profondeurs de la préparation. Durée du pulse : 6 sec.

C- COMPARAISON DES TRACES DES FLUX IONIQUES ET DE L'EOG

Cette comparaison est faite en prenant comme repères la durée et le déroulement de la phase de dépolarisation de l'EOG et en superposant les tracés des variations de aK et de aCa en réponse à la stimulation odorante.

Notons que les temps de réponse des électrodes K-MIS et Ca-MIS sont du même ordre (0.1 à 0.2 sec.) comme nous l'avons déterminé par éjection de K et de Ca *in vitro*.

La figure 18, A montre que pour des stimulations de faible intensité (EOG : 4 mV) la réponse Ca est, comme nous l'avons vu plus haut, contemporaine de l'EOG et atteint son maximum 2 à 3 secondes avant que la réponse K ne se stabilise à sa valeur maximale. Pour les stimulations intenses (Fig. 18, B), le retard de la réponse K par rapport à la réponse Ca est moins bien visible.

En outre, l'examen des vitesses de retour à l'activité ionique de base montre que, quelle que soit l'intensité de stimulation (Fig. 18, A, B), le rééquilibrage de aCa_0 se fait plus rapidement que celui de aK .

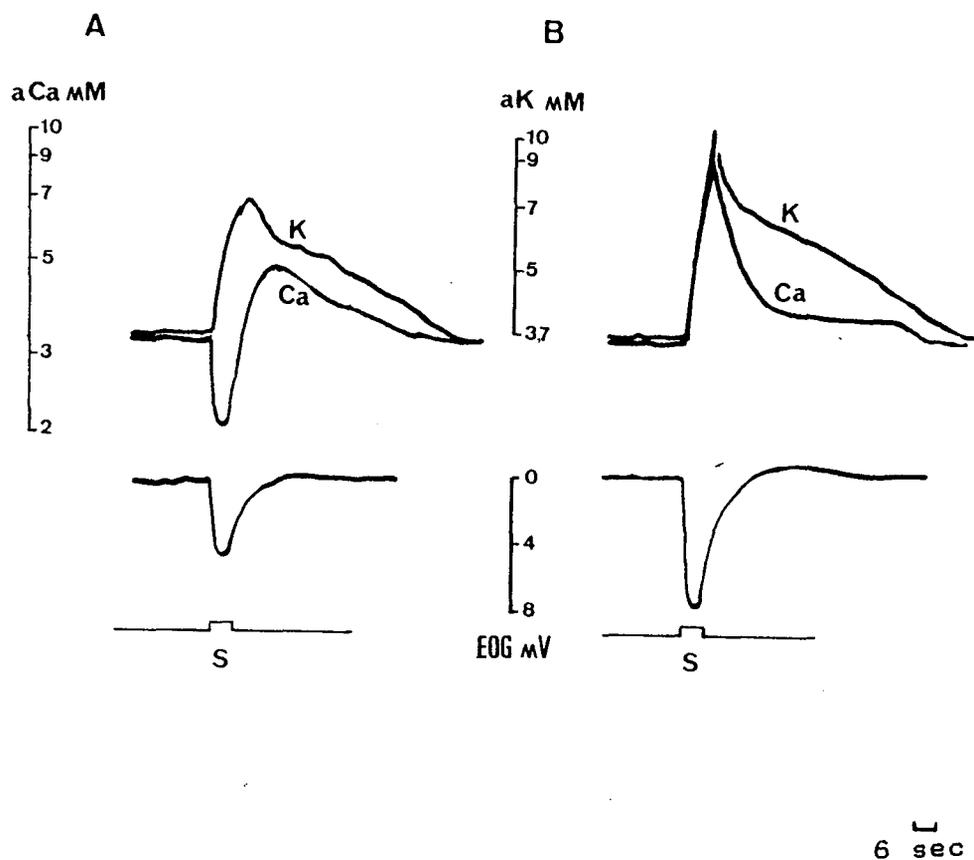


FIGURE 18 :

Comparaison entre les réponses potassiques et calciques et l'EOG enregistrés dans le mucus.

A- Stimulation de faible intensité (EOG : 5 mV). La baisse de aCa est contemporaine de l'EOG alors que la réponse K n'est maximale qu'à la fin de la stimulation.

B- Stimulation intense (EOG : 8 mV). L'amplitude maximale des réponses Ca et K est atteinte pendant la phase de dépolarisation de l'EOG.

II- DISCUSSION

A- Flux potassiques associés à la formation de l'EOG (KHAYARI, MATH et TROTIER, 1989 b)

Durant la stimulation odorante les neurorécepteurs (NRC) sont dépolarisés, les ions Na^+ entrent dans les récepteurs au niveau de la partie apicale, les ions K^+ , quant à eux, quittent les cellules par les membranes dendritique et somatique (TROTIER et MAC LEOD, 1983;1986). L'efflux de K^+ vers l'espace extracellulaire y provoque une augmentation de l'activité potassique (aK) qui est confirmée par les calculs théoriques (KHAYARI *et al*, 1989 b). Partant d'une cellule de moyenne taille ayant une dendrite ($1.5 \times 60 \mu\text{m}$) et un corps cellulaire ($10 \times 6 \mu\text{m}$), cette cellule sera entourée de 40 pl de milieu extracellulaire. Si la cellule est dépolarisée par un courant de 5 pA, qui est suffisant pour produire un PA dans la cellule dont l'impédance d'entrée est assez élevée (TROTIER et MAC LEOD, 1983), cette dépolarisation aboutira à une variation de aK de 5 mM pour 40 pl. Cette valeur n'est, en fait, jamais atteinte car les phénomènes de recapture interviennent dans le sens d'une limitation de l'amplitude de l'augmentation de aK. Cependant, plusieurs cellules sont dépolarisées simultanément par la bouffée odorante; elles contribuent donc à l'augmentation de aK et expliquent les fortes variations d'activité enregistrées par la K-MIS au cours de la stimulation odorante.

Par ailleurs, les cellules de soutien, dont les enregistrements intracellulaires (TROTIER et MAC LEOD, 1983) ont montré qu'elles avaient un potentiel de repos de l'ordre de - 96 mV et une résistance d'entrée assez faible ($15 \text{ M}\Omega$); pourraient contribuer à l'efflux potassique. En effet, la sensibilité de ces cellules au K^+ extracellulaire est identique à celle des cellules gliales et leur dépolarisation par le stimulus odorant, qui est de longue durée et proportionnelle à l'amplitude de l'EOG (TROTIER et MAC LEOD, 1986), est comparable de par son amplitude et sa durée à la réponse enregistrée par la K-MIS.

Ainsi les deux approches montrent une accumulation de K^+ dans l'espace extracellulaire en réponse à la stimulation odorante. Nous avons observé que les réponses potassiques débutaient après l'EOG dont l'initiation est due, au moins en partie, aux flux calciques (voir plus loin), ceci suggère,

que les molécules odorantes doivent d'abord activer les neurorécepteurs avant qu'il n'y ait efflux de K^+ . La topographie de la surface transductive est certainement responsable du décalage existant entre la réponse K^+ et l'EOG. En effet, la surface transductive représentée par la membrane ciliaire est localisée au niveau de la face apicale de l'épithélium olfactif où se trouvent également les microvillosités des cellules de soutien. Si l'on tient les cellules de soutien et leurs microvillosités pour responsables de l'efflux de K^+ , il est probable, compte tenu de la diffusion des molécules odorantes dans le mucus (BAYLIN, 1979), que le délai séparant les réponses des neurorécepteurs et des cellules de soutien soit dû au décalage temporel de l'activation de ces deux structures.

Une autre explication pourrait trouver son origine dans un processus sécrétoire. Cette hypothèse a été avancée pour expliquer l'énorme quantité de K^+ (70 mM) mesurée dans le mucus par spectrophotométrie de flamme (BRONSTEIN et LEONT'EV, 1972); il faut rappeler les échantillons de mucus prélevés par ces auteurs contenaient des cils olfactifs donc probablement une quantité non négligeable de matériel intracellulaire. De plus, l'activité sécrétoire des glandes et des cellules de soutien a récemment été décrite dans l'appareil olfactif de la salamandre en réponse à une sollicitation olfactive (SHEPHERD *et al*, 1986).

Quelle que soit l'origine du flux potassique, nous pouvons présumer que l'augmentation de aK dans le mucus et dans la partie apicale de l'épithélium reflète bien l'activation des neurorécepteurs qu'elle soit mesurée comme ici par une K-MIS ou par une "électrode biologique", la cellule sustentaculaire (TROTIER et MAC LEOD, 1983). Par ailleurs, cette élévation proximale de aK pourrait être due à l'ouverture des nombreux types de canaux potassiques décrits dans les NRC et dont le rôle consisterait à repolariser les NRC après un PA (MAUE et DIONNE, 1987) et/ou à limiter la dépolarisation en cas de stimulation intense (TROTIER, 1986). Ceci semble en accord avec l'existence d'un retard notable du maximum de la variation de aK sur l'EOG (cf RESULTATS).

Le fait que l'augmentation de aK provoquée par la stimulation odorante diminue en amplitude au fur et à mesure que la K-MIS s'engage dans l'assise épithéliale, résultat qui est, au demeurant, en accord avec la décroissance de l'EOG en profondeur (MOULTON et BEIDLER, 1967), constitue un argument supplémentaire en faveur de la localisation apicale de la zone transductrice. Notons l'absence, au repos, de gradients potassiques au

sein de l'épithélium ou entre le mucus et l'épithélium, ce que traduit bien l'absence de différences significatives entre les valeurs de aK_o dans le mucus et dans l'assise épithéliale. Nous verrons plus loin qu'il n'en est pas de même pour le calcium qui semble jouer un rôle primordial dans la transduction olfactive (cf plus loin).

Notons également que l'application iontophorétique de K^+ dans le mucus provoque une élévation de aK dans le mucus et dans l'assise épithéliale mais l'augmentation de la distance séparant la K-MIS (descendue dans l'épithélium) de la source iontophorétique (restée en surface) fait décroître l'amplitude de la variation potassique. Ce résultat confirme que la diffusion du K^+ dans l'épithélium se fait selon les équations de diffusion de CURTIS *et al* (1960) et NICHOLSON *et al* (1979), c'est-à-dire sans barrière de diffusion (voir INTRODUCTION).

L'enregistrement des variations de aK en profondeur a montré que l'élévation de aK en réponse à la stimulation odorante est précédée par une phase de décroissance de aK . L'application de K^+ exogène n'a jamais fait baisser aK dans nos essais; ceci nous autorise à penser que la chute de aK serait le résultat de l'activation d'un mécanisme de repompage du K^+ . En effet, l'application d'ouabaïne dans l'épithélium supprime l'onde négative induite par la stimulation odorante et augmente l'amplitude de l'onde positive confirmant ainsi qu'un pompage actif par les Na^+ , K-ATPases, localisées selon toute vraisemblance dans la partie basale des cellules épithéliales, pourrait être à l'origine de l'onde négative. Bien qu'elle précède l'onde positive, cette composante négative de la réponse potassique profonde est déclenchée par la stimulation ou mieux encore, par l'élévation de aK en surface. En d'autres termes, nous pouvons penser que la dépolarisation du neurorécepteur et de son soma provoque la stimulation de l'activité Na, K-ATPase en profondeur qui favorise le pompage du K^+ alors que du K^+ est libéré en surface. Le maintien de l'équilibre électrolytique, et plus précisément les gradients potassiques, est probablement très important car le blocage de la Na,K-ATPase provoque une chute rapide de l'amplitude de l'EOG. Ce résultat a également été rapporté par BRONSTEIN et LEONTEV (1972). L'utilisation de K-MIS dans la rétine (DICK et MILLER, 1985) pour enregistrer les variations de aK accompagnant les différentes ondes de l'électrorétinogramme, a permis de caractériser deux élévations de aK , une proximale et une distale, et une diminution distale de aK qui traduirait une

hyperpolarisation des membranes apicales des cellules épithéliales et qui pourrait hyperpolariser les cellules de Müller.

Compte tenu de ce que nous venons de détailler, l'origine de l'onde positive profonde est à rechercher au niveau du rôle inhibiteur que pourrait avoir le K^+ en cas d'accoutumance à une odeur (GESTELAND *et al*, 1965). Il a été démontré, à ce propos, que la stimulation antidromique du nerf olfactif se traduit par l'apparition d'une seconde et lente dépolarisation des neurorécepteurs dont l'amplitude augmente en réponse à un double choc du nerf olfactif (TROTIER et MAC LEOD, 1986). Les auteurs suggèrent que cette seconde dépolarisation résulterait d'une onde de concentration du K^+ qui prendrait naissance au niveau des bandelettes d'axones des neurorécepteurs. Evoquons, enfin, les courants potassiques sortants réctifiants dûs à l'activation, aux potentiels d'hyperpolarisation, de canaux K à longue durée d'ouverture (TROTIER, 1986). Ces courants pourraient être à l'origine de la composante profonde de l'élévation de aK.

B- Flux calciques

Le métabolisme calcique dans l'épithélium olfactif se distingue du métabolisme potassique par un certain nombre de particularités dont voici les principales:

- L'évaluation de l'activité calcique de base (aCa_0) a montré qu'il existait un gradient calcique entre le mucus et l'assise épithéliale. En effet, aCa_0 dans l'épithélium proprement dit a une valeur physiologique typique c'est-à-dire voisine de la millimole. A l'inverse, aCa_0 dans le mucus a une valeur quasiment trois fois supérieure à celle mesurée dans l'assise épithéliale. La transition entre ces deux valeurs est brutale et coïncide avec les données anatomiques car la profondeur à laquelle nous passons de 3 millimoles à 1 millimole correspond à l'interface mucus/épithélium, c'est-à-dire à la partie apicale de la surface réceptrice. Ajoutons qu' au sein de l'assise épithéliale aCa_0 n'est pas uniforme; en effet, nous avons mesuré une différence notable entre les parties apicale et basale, le déséquilibre (0.3 mM environ) étant en faveur de la partie basale.

Avant même d'examiner les réponses calciques aux odeurs, nous pouvons, d'ores et déjà, dire que le gradient calcique dont l'épithélium olfactif est le siège, est probablement maintenu activement le long et de part et d'autre de l'interface mucus/épithélium. La chute brutale de aCa_0 quand la

Ca-MIS traverse cette interface et l'absence de diffusion du Ca^{++} appliqué en surface au delà de cette barrière plaident en faveur de cette hypothèse. L'agrégation des cellules épithéliales et l'existence de jonctions intercellulaires de type jonction serrée (tight-junction) entre les membranes des neurorécepteurs et des cellules de soutien favorisent donc la séparation de deux milieux ioniques (apex / base); cette séparation pourrait déterminer la sensibilité chimique aux stimuli odorants (MAUE et DIONNE, 1987).

- L'examen de la réponse calcique à l'application de stimulations odorantes nous fournit deux renseignements essentiels. En effet, la réponse calcique se présente sous forme d'une chute de $a\text{Ca}$ suivie d'une élévation qui est plus ample dans le mucus. L'amplitude de l'onde positive peut atteindre une dizaine de millimoles en cas de sollicitation intense (EOG de 8 à 10 mV) ce qui masque l'onde négative dont l'amplitude peut baisser ou s'annuler. Si l'onde négative est aisément explicable du fait qu'elle est observée dans d'autres régions du S.N., la réponse positive est certainement moins facile à caractériser.

Compte tenu des gradients transmembranaire et transépithélial, la quantité de calcium véhiculée par l'onde positive de la réponse calcique doit représenter, en toute rigueur, non pas un efflux de calcium depuis les cellules épithéliales mais probablement une libération de calcium lié ou une sécrétion de Ca^{++} par les cellules glandulaires. La diminution de l'amplitude de l'onde positive en profondeur plaide dans le sens d'une libération de Ca^{++} dans le mucus par les mucopolysaccharides ou les protéines sécrétés par les cellules sécrétrices. Les candidates pour ce processus sécrétoire sont les glandes de Bowman dont les conduits s'ouvrent à la surface de l'épithélium sans oublier les cellules sustentaculaires. Les sécrétions de ces dernières pourraient servir à protéger le système olfactif.

Ainsi, nous pensons que l'augmentation de $a\text{Ca}$ ferait partie du processus d'inactivation des récepteurs et qu'elle résulterait de la libération de Ca lié au matériel sécrété par les glandes de Bowman et/ou les cellules sustentaculaires. Certes, cette éventualité n'est pas démontrée mais elle représente, à notre sens, une hypothèse qui mérite examen.

Le deuxième renseignement fourni par l'examen des réponses calciques réside dans le fait que la baisse de $a\text{Ca}$ est contemporaine de l'EOG. En effet, la baisse de $a\text{Ca}$ débute en même temps que l'EOG et ne présente donc aucun retard par rapport à celui-ci comme c'est le cas pour la réponse potassique (voir plus haut). Ce résultat est, par conséquent, en faveur d'une

intervention directe des ions Ca^{++} dans la formation de l'EOG. Nos essais de blocage de cette baisse de aCa par le cobalt montrent que le cobalt peut, à forte dose ($> 150 \text{ nA}$), supprimer cette réponse calcique et affecter considérablement la réponse potassique qui est réduite de près de 80%. SUZUKI (1978) a montré, chez la Lamproie, que le blocage des canaux calciques par le Co^{++} ou l'abaissement de la concentration calcique extracellulaire inhibaient l'activité des neurorécepteurs. En outre, des courants calciques entrants et TTX-résistants ont été décrits dans les membranes des NRC (MAUE et DIONNE, 1987; TROTIER, 1986). Ces courants sont bloqués par le cobalt (TROTIER, 1986) comme l'est la baisse de aCa dans nos travaux; il est donc probable que ces deux événements soient liés.

Par ailleurs, MAIR *et al* (1982a) ont montré que le mouvement des cils des neurorécepteurs est modulé par l'entrée de Ca^{++} dans les neurorécepteurs à travers des pores potentiel-sensibles. Après l'activation des neurorécepteurs et l'augmentation de la conductance calcique, il y'a une phase d'inactivation pendant laquelle les mouvements ciliaires deviennent synchrones. Ces mouvements ciliaires, qui peuvent être provoqués par l'application d'ions Co^{++} ou La^{+++} ou par l'abaissement de la concentration calcique extracellulaire, favoriseraient l'arrêt de l'activation des neurorécepteurs en éluant les résidus du stimulus odorant (MAIR *et al*, 1982a).

Les flux ioniques que nous venons de décrire dans l'épithélium olfactif de grenouille sont issus de plusieurs cellules épithéliales activées suite à la stimulation odorante. Les P.A. initiés dans les neurorécepteurs sont véhiculés par les fibres du nerf olfactif jusqu'au bulbe où ces fibres se terminent dans des glomérules au sein desquels une sommation due au haut degré de convergence des afférences primaires, favorisera l'amplification des flux ioniques issus de milliers de terminaisons nerveuses.

Certaines études (JAHR et NICOLL, 1981, ENG et KOCSIS, 1987) ont montré que l'augmentation de l'activité potassique extracellulaire modulait l'excitabilité des fibres du N.O.. A cet égard, le cas du N.O. est d'autant plus intéressant que les signaux véhiculés par certaines fibres ont une action inhibitrice sur ceux véhiculés par les fibres adjacentes (VORONKOV et GUSEL'NIKOVA, 1972).

C'est le devenir de ces signaux transmis au bulbe *via* le nerf olfactif que nous allons examiner dans la deuxième partie de ce travail.

Il faut noter que l'étude qui va suivre a été réalisée chez le rat et non chez la grenouille comme la précédente. Les raisons de ce choix ont été évoquées dans la partie MATERIELS ET METHODES.

2ème PARTIE
VARIATIONS DU METABOLISME MINERAL
ET MATURATION DE L'INHIBITION GABA-ERGIQUE
DANS LES GLOMERULES OLFACTIFS DU RAT

I- INFLUENCE DE L'ACTIVATION DES AFFERENCES PRIMAIRES SUR LE METABOLISME MINERAL AU NIVEAU DES BULBES OLFRACTIFS DU RAT ADULTE.

RESULTATS

Cette étude a été réalisée sur des rats âgés de 35 à 40 jours PN chez lesquels trois valeurs témoins ont été préalablement déterminées. Il s'agit des activités potassique et calcique extracellulaires au niveau de plusieurs couches bulbaires et de la fréquence des potentiels extracellulaires.

* L'activité potassique de base (aK_o) est significativement ($p < 0.01$) plus élevée au niveau de la couche glomérulaire où elle est de 4.0 ± 0.3 mM qu'au niveau des autres couches bulbaires où elle a une valeur moyenne de 3.3 ± 0.4 , $n = 33$.

* L'activité calcique de repos (aCa_o) mesurée à l'aide d'électrodes Ca-MIS est de 1.0 ± 0.1 mM, $n = 12$.

* La fréquence d'émission spontanée des neurones bulbaires est de 16.5 ± 2.5 PA/sec.

Aucune différence significative n'a été observée entre les différentes couches bulbaires pour ces deux dernières valeurs.

A- STIMULATIONS ELECTRIQUES DU NERF OLFRACTIF

L'électrode de stimulation (voir MATERIELS et METHODES) est insérée dans la couche du nerf olfactif à une profondeur de -10 à -20 μ m. Elle est positionnée 1 mm en avant de la K-MIS de telle sorte qu'elle soit alignée avec celle-ci dans le plan caudo-rostral. Dans cette position, les stimulations délivrées provoquent une activation des fibres se terminant dans la région où la K-MIS est insérée (Fig. 19).

Compte-tenu de l'absence de myélinisation des fibres du N.O. et du diamètre de ces fibres (0.2 μ m en moyenne) qui sont organisées en faisceaux de 25 à 100 fibres (SHEPHERD, 1972), les stimulations délivrées par l'électrode de tungstène (diamètre de pointe de 20 à 30 μ m) activent orthodromiquement plusieurs faisceaux de fibres (voir l'étude de FREEMAN, 1974a pour un complément d'information sur le recouvrement des faisceaux stimulés).

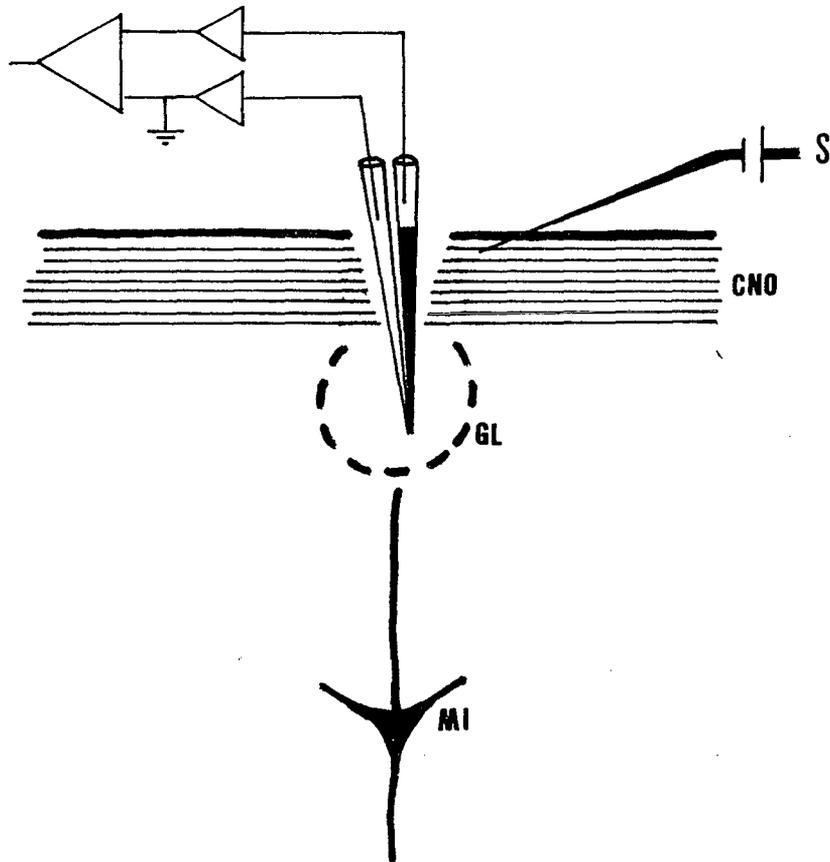


FIGURE 19 :

Schéma montrant la mise en place de la K-MIS et de l'électrode de stimulation (S).

CNO : couche du nerf olfactif; GL : couche glomérulaire; Mi : cellule mitrale.

1- Paramètres de stimulation

Les paramètres de stimulation utilisés sont du même ordre que ceux donnés par MATH et DAVRAINVILLE (1980), à savoir une intensité variant entre 1 et 8 V, une largeur de 1 msec et une fréquence allant de 10 à 50 Hz.

Nous rappelons, à titre indicatif, que YAMAMOTO *et al* (1963) ont utilisé des intensités allant de 5 à 20 V (0.7 msec) pour stimuler l'épithélium olfactif, et que ENG et KOCSIS (1987) montrent que l'augmentation de la fréquence de stimulation provoque une augmentation de la dépolarisation des fibres du N.O.

La stimulation électrique du N.O. provoque une variation de aK mesurée par la K-MIS qui dépend de l'intensité de la stimulation. Les stimulations dont l'intensité est supérieure ou égale à 1 V provoquent une variation mesurable de aK. Nous avons choisi une intensité moyenne de 4 V (1 msec, 50 Hz) pour la suite des essais. Cette stimulation aboutit à une élévation de aK de 1.1 ± 0.3 mM (n = 33) au niveau de la couche glomérulaire où la variation de aK est plus ample que dans les autres couches bulbaires (0.5 ± 0.3 mM, n = 33). La figure 20 donne l'amplitude de la réponse en fonction de la profondeur à laquelle la variation de aK est enregistrée.

Lorsque la stimulation est plus intense (6 V, 50 Hz) elle produit une variation de aK qui est sensiblement plus ample (Fig. 20). De plus, au niveau glomérulaire, la réponse est composite; en effet, nous observons une réponse primaire dont l'amplitude est de 1.8 ± 0.4 mM (n = 33) suivie d'une seconde variation transitoire en cloche s'ajoutant à la première et que nous avons appelée "pic K⁺" (Fig. 21).

Le pic K⁺ apparaît après une latence de 21.92 ± 5.5 sec, temps pendant lequel se produit la variation primaire. La durée du phénomène est de 21.60 ± 5.84 sec et son amplitude est de 3.00 ± 1.05 mM (n = 33; Fig 21).

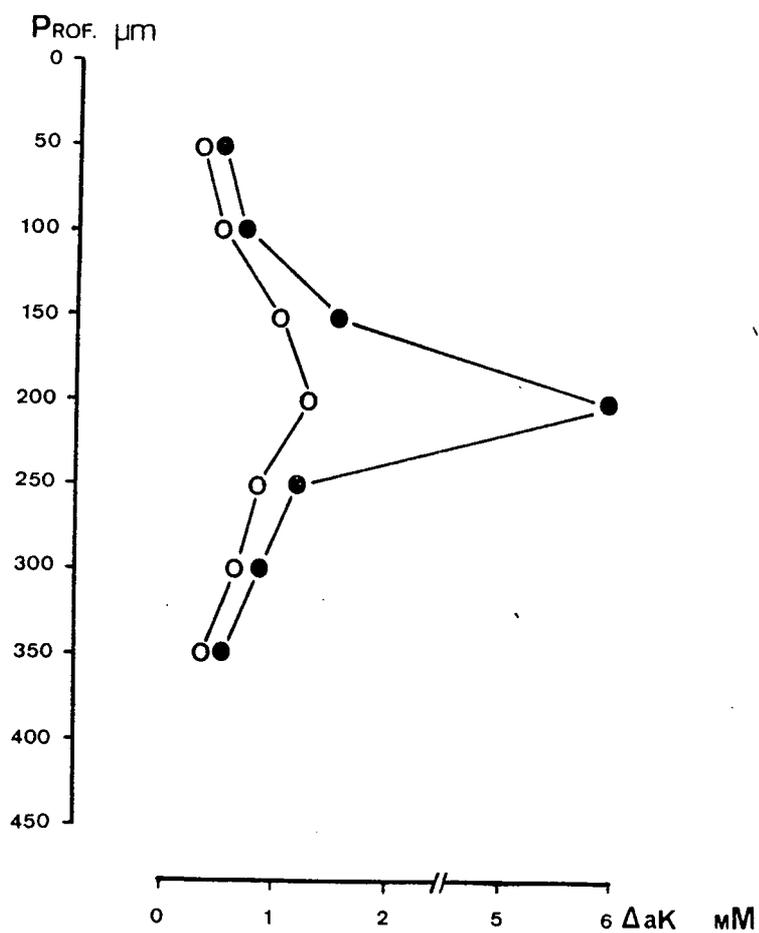


FIGURE 20 :

Variations de l'activité potassique extracellulaire (aK, mM) en réponse à la stimulation du nerf olfactif en fonction de la profondeur de la K-MIS.

O : Stimulation à 4 V, 50 Hz.

● : Stimulation à 6 V, 50 Hz.

Chaque point représente la moyenne de 35 déterminations.

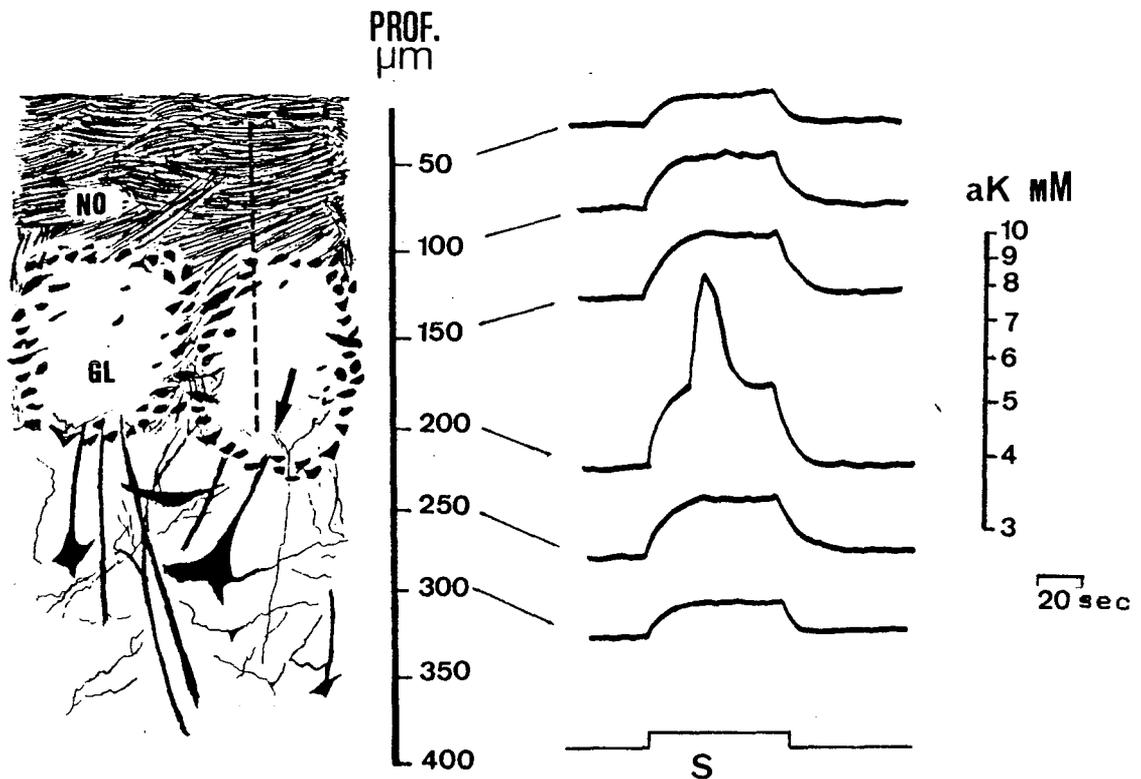


FIGURE 21 :

Variations de aK en réponse à une stimulation (S) de 6 V, 50 Hz en fonction de la profondeur.

A- Dessin en camera lucida d'une coupe du B.O. colorée selon la méthode de NAUTA-GIGAX et qui montre l'emplacement de la pointe de la K-MIS (flèche) quand elle enregistre un pic K+.

N.O. : nerf olfactif; GL : glomérule; PROF : profondeur.

B- Réponses produites à différentes profondeurs par la stimulation (S) du N.O. Le pic K+ est enregistré quand la K-MIS se trouve au niveau du pôle basal du glomérule.

2- Seuil d'apparition du pic K

Afin de savoir si l'amplitude de la variation primaire détermine l'apparition du pic K⁺, nous avons fait varier l'intensité et/ou la fréquence de stimulation du N.O. Comme le montre la figure 22, une stimulation à 4 V, 50 Hz ou 6 V, 10 Hz n'aboutit pas à l'apparition d'un pic K⁺ car l'amplitude de la variation de aK est seulement de 1 mM. A l'inverse, des stimulations supérieures ou égales à 6 V, 30 Hz provoquent l'apparition d'un pic K⁺ dès que la réponse primaire a atteint une amplitude supérieure ou égale à 1.5 mM. Ceci suggère que l'amplitude de la variation primaire est déterminante dans l'apparition ultérieure d'un pic K. Il faut noter que la latence et l'amplitude du pic K⁺ dépendent de l'intensité et de la fréquence de la stimulation. Ainsi, la latence est de 16 sec pour une stimulation à 8 V, 50 Hz; de 22 sec à 6 V, 50 Hz et 37 sec à 6 V, 30 Hz. L'amplitude, quant à elle, est respectivement de 3.3 ; 2.5 et 1.6 mM (Fig. 22). Ceci indique que le pic K⁺ n'est pas d'emblée maximal.

3- Localisation du pic K

Comme nous l'avons dit plus haut, le pic K⁺ se produit uniquement dans la couche glomérulaire. Cependant, nous avons remarqué qu'il ne suffisait pas de positionner la K-MIS dans la couche glomérulaire pour obtenir un pic K en réponse à une stimulation efficace du nerf olfactif. En effet, la K-MIS doit être nécessairement placée à une profondeur de $200 \pm 30 \mu\text{m}$ (n = 27), ce qui correspond au pôle basal du glomérule. Ceci est, d'ailleurs, confirmé par le marquage au Fast Green de l'emplacement de la pointe de la K-MIS (voir MATERIELS et METHODES).

4- Distribution du pic dans la couche glomérulaire

A l'aide d'un assemblage de deux K-MIS, nous avons fait des essais pour vérifier si la stimulation du N.O. à un seul endroit produit ou non un pic K⁺ dans les glomérules adjacents et en quelque sorte si le phénomène "se propage" aux glomérules voisins par la voie des interneurons de la région juxtaglomérulaire.

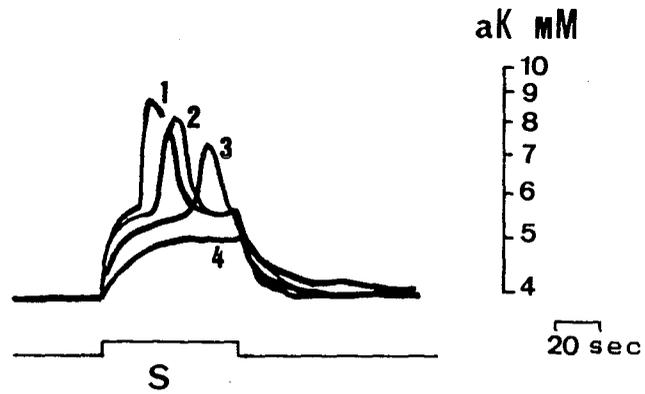


FIGURE 22 :

Influence de l'intensité de stimulation électrique (S) sur les variations potassiques.

1 : 8 V, 50 Hz

2 : 6 V, 50 Hz

3 : 6 V, 30 Hz

4 : 4 V, 50 Hz / 6 V, 10 Hz.

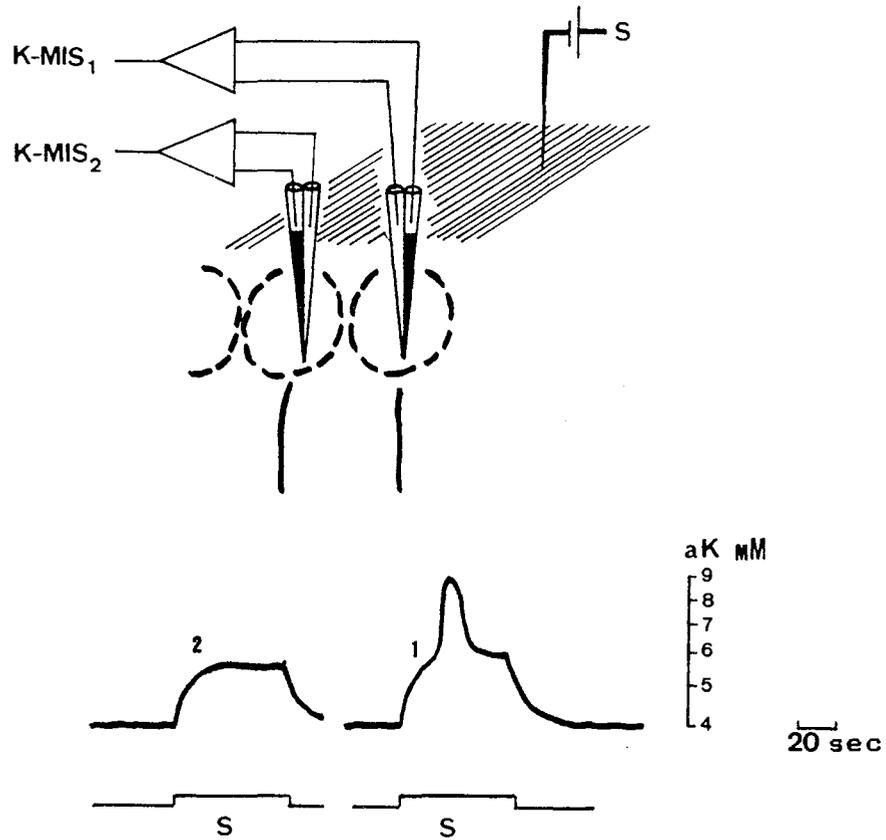


FIGURE 23 :

Position des deux électrodes d'enregistrement K-MIS1 et K-MIS2 dans la couche glomérulaire et variations potassiques enregistrées par chaque K-MIS en réponse à la stimulation (S) du nerf olfactif. L'électrode de stimulation est placée dans l'alignement de K-MIS1.

Nous avons utilisé deux K-MIS séparées dans le plan horizontal de 150 à 200 μm , le diamètre moyen d'un glomérule (voir INTRODUCTION), et implantées dans la couche glomérulaire (Fig. 23). Avec ce dispositif, l'application de la stimulation provoque l'apparition d'un pic K^+ uniquement dans le glomérule au niveau duquel est présumée se terminer la majorité des fibres stimulées (Fig. 23). Il faut noter que les variations primaires de aK sont observées au niveau du glomérule où apparaît le pic mais également au niveau du glomérule voisin et sont quasiment de même amplitude. Ceci confirme le fait que la stimulation du N.O. peut dépolariser plusieurs faisceaux de fibres en raison de l'absence de myélinisation de celles-ci.

5- Influence de la stimulation du N.O. sur l'activité électrique glomérulaire

Nous avons enregistré les PA extracellulaires des cellules mitrales au niveau glomérulaire et leur modification pendant la stimulation du nerf olfactif. Nous avons tenu compte uniquement des PA caractéristiques des deutoneurones bulbaires dont l'amplitude moyenne est de 4 à 5 mV.

La plupart des réponses enregistrées avec des stimulations supérieures à 4 V, 30 Hz est de nature inhibitrice, c'est-à-dire aboutissant à une baisse de fréquence des PA extracellulaires. Il faut noter que cette diminution est proportionnelle à l'amplitude de la réponse primaire. A l'application d'une stimulation produisant un pic K^+ (stimulation efficace), la fréquence des PA passe de 17.8 ± 0.7 à 11.6 ± 4.2 PA / sec pendant les 20 premières secondes c'est à dire pendant l'apparition de la variation primaire de aK. Ensuite, la fréquence s'effondre à 0.5 ± 1.2 PA / sec pendant toute la durée du pic K^+ (Fig. 24).

Ainsi, la fréquence des potentiels émis par les cellules de la région glomérulaire peut s'annuler totalement pendant la formation du pic K^+ ; la seule activité électrique décelable est alors celle relative aux interneurones.

Après l'arrêt de la stimulation efficace, le retour à la fréquence de base se fait selon deux modalités différentes. Dans certains enregistrements, le retour se fait de manière progressive en 1 à 1 min 30; Dans d'autres cas, il apparaît une phase d'activation post-stimulatoire pendant laquelle des salves de décharges d'une fréquence plus élevée (19 à 23 PA / sec) par rapport au témoin (Fig. 24, astérisque) sont enregistrées. Ces deux cas de figure sont rencontrés dans des proportions presque égales.

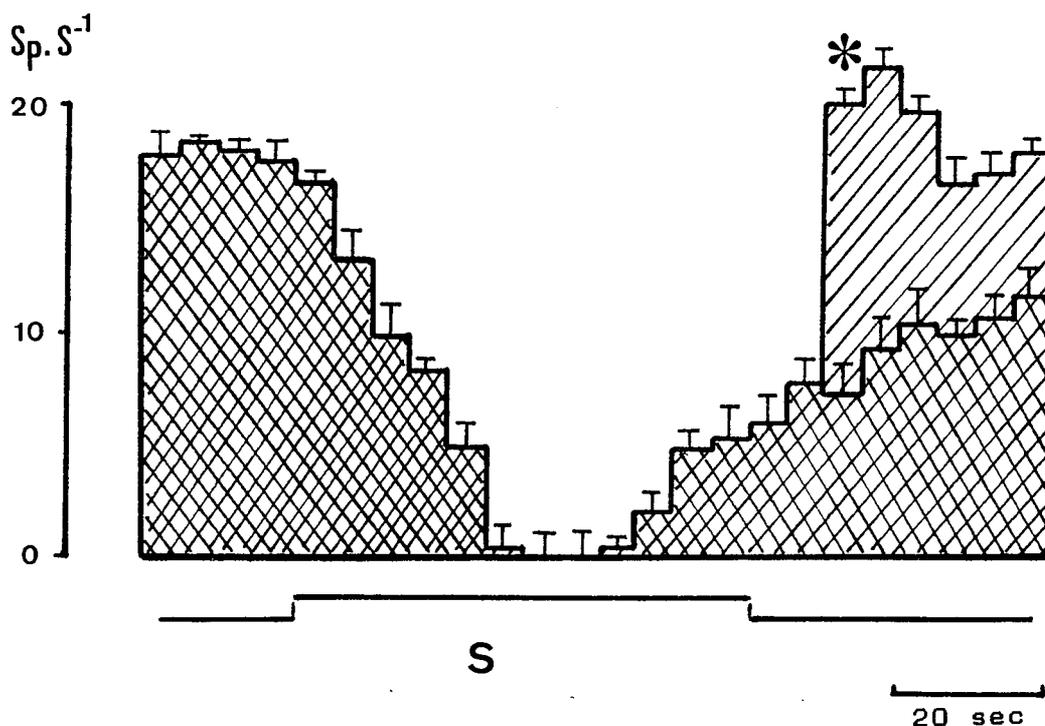


FIGURE 24 :

Histogrammes de distribution des fréquences de décharge des cellules mitrales.

La stimulation (S) provoque une chute progressive de la fréquence des PA, puis une chute brutale accompagnant la formation du pic K⁺.

Après l'arrêt de la stimulation, deux types de retour à la fréquence de base sont observés, il s'agit soit d'un retour progressif à la fréquence normale soit de l'apparition d'after- discharges de forte amplitude qui font augmenter la fréquence au-delà de la fréquence témoin.

Sp. S⁻¹ : spikes / sec.

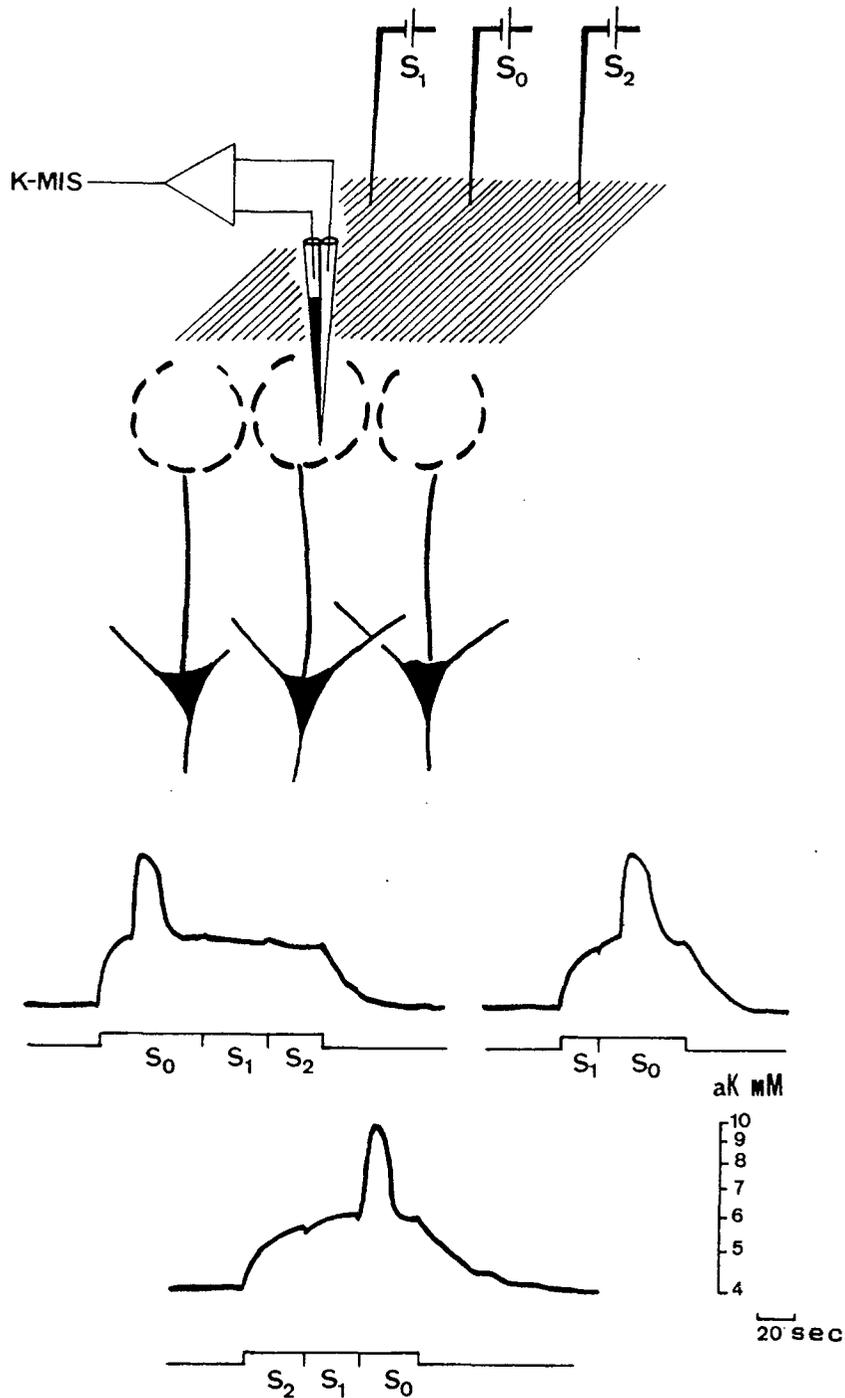


FIGURE 25 :

Effets des stimulations multiples du N.O. sur les variations potassiques dans le glomérule.

Les stimulations sont délivrées par une stimulatrice (S₀) positionnée sur le trajet des fibres se terminant dans le glomérule où est placée la K-MIS.

Les stimulatrices S₁ et S₂ sont positionnées à 300 μm à droite et à gauche de S₀.

En dépit de la production d'une variation primaire de aK par les stimulations délivrées par S₁ et S₂, seule la stimulation par S₀ produit un pic K⁺.

B- STIMULATIONS MULTIPLES

En procédant à la stimulation du N.O. au niveau de plusieurs points, nous avons cherché à déterminer les effets de l'apparition du pic K^+ (ou du potassium apparaissant lors de la formation du pic K^+) sur les glomérules adjacents.

Un assemblage de trois électrodes de stimulation dont les pointes sont séparées de 300 à 350 μm (voir MATÉRIELS et MÉTHODES) a été implanté à - 20 à - 30 μm dans le nerf olfactif perpendiculairement à la K-MIS. Cet assemblage nous a permis de stimuler différents faisceaux de fibres supposés longer la surface bulbaire de manière parallèle jusqu'aux glomérules où ils se terminent (Fig. 25). L'électrode centrale de stimulation est placée en face de la K-MIS unique.

Seule la stimulation délivrée par l'électrode centrale (S_0) produit un pic K dans le glomérule où est placée la K-MIS. La stimulation délivrée par les électrodes S_1 et S_2 placées à droite et à gauche de la K-MIS ne produit qu'une variation de type primaire sans apparition ni ébauche du pic K. La stimulation multiple, quelle que soit la combinaison (S_1 puis S_0 , S_2 puis S_0 ou S_1 puis S_2 puis S_0) n'empêche pas le pic d'apparaître, mais réduit la latence d'apparition du phénomène (Fig.25); dans ce cas, le pic K apparaît juste après le début de la stimulation délivrée par S_0 . Il semble donc que la stimulation par S_1 et S_2 ait un effet facilitateur sur l'apparition du pic K provoqué par la stimulation par S_0 .

C- INFLUENCE DE LA COMPOSITION ELECTROLYTIQUE DU MILIEU EXTRACELLULAIRE SUR LE PIC K

Par l'application microiontophorétique d'ions K^+ , Ca^{++} ou Co^{++} , nous avons essayé de provoquer des modifications ponctuelles et de courte durée de la composition électrolytique des espaces glomérulaires (Fig. 26.)

1 - Influence des ions potassium

a - K seul, chargement du glomérule en K

L'application iontophorétique de K^+ à partir d'une pipette placée à 20 μm de l'électrode MIS permet d'obtenir une élévation aK de manière dose-dépendante. Pour un courant d'éjection de 60 nA, l'élévation de aK est de $1.8 \pm 0.3 \text{ mM}$

L'application du K, nous a permis d'atteindre et de dépasser la valeur de la variation primaire qui était de $1,8 \pm 0,4 \text{ mM}$ enregistrée en réponse à la stimulation du NO et à partir de laquelle se formait le pic K. Cependant, les tests d'application du K n'ont jamais à eux seuls permis l'apparition spontanée du pic K. Ainsi, l'iontophorèse de K dans le glomérule utilisant des courants élevés ($>500 \text{ nA}$) provoquent une augmentation de aK jusqu'à 7-10 mM sans induire la formation d'un pic K.

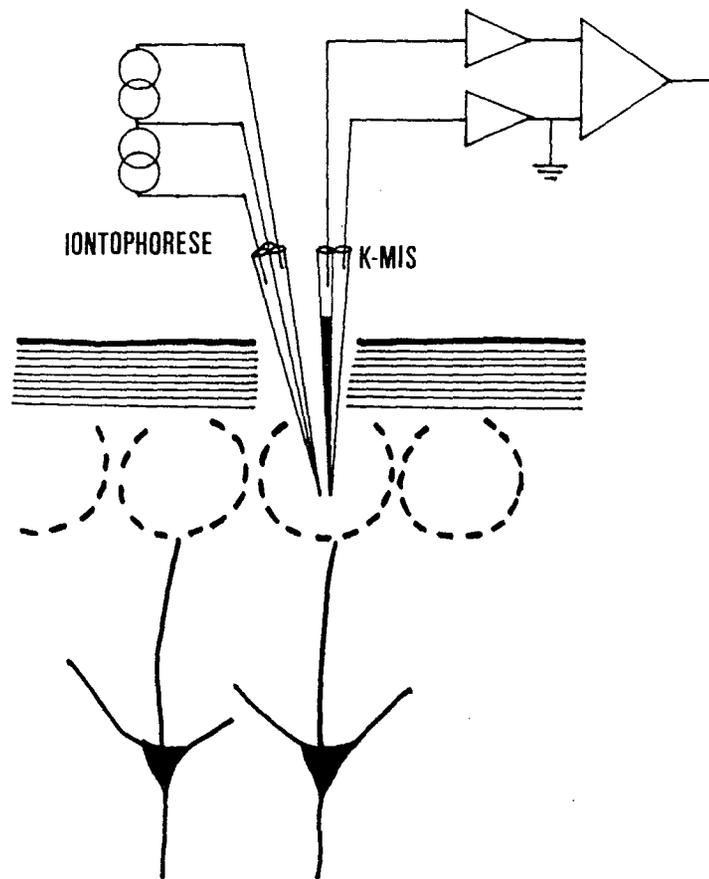


FIGURE 26 :
Schéma montrant la position de l'assemblage des électrodes K-MIS et d'iontophorèse dans le glomérule olfactif.

b- Stimulation et application de K

Lorsqu'on augmente artificiellement aK glomérulaire par application de K exogène, un pic K peut apparaître en réponse à la stimulation du NO. Il a les caractéristiques suivantes (Tableau I, Fig. 27):

- L'amplitude du pic est augmentée (3.95 ± 1.35 mM)
- Le temps de latence est plus court (13.26 ± 3.64 sec.)
- La durée est accrue (31.72 ± 5.91 sec.)

Solution éjectée (mM)	Amplitude (mM)	Durée (sec)	Latence (sec)
Témoin	3.00 ± 1.05	21.60 ± 5.84	21.92 ± 5.50
K Cl 0.1 M	3.95 ± 1.35	31.72 ± 5.91	13.26 ± 3.64
Ca Cl ₂ 0.1 M	2.50 ± 1.10	20.44 ± 2.80	35.88 ± 6.44

TABLEAU I. Modification des caractéristiques (amplitude, durée et latence) du pic K par l'application iontophorétique de K Cl et Ca Cl₂. L'activité potassique de base est de 4.4 mM. Le courant d'éjection est de 100 nA. Les valeurs représentent les moyennes \pm E.S. de n = 33 tests.

2 - Le pic K est-il un artéfact ?

Pour lever toute éventuelle ambiguïté sur la nature du pic K dont on pourrait supposer qu'il provient d'une anoxie ou d'une dépression envahissante causée par des lésions tissulaires nous avons provoqué ces phénomènes et comparé leurs effets sur aK avec ceux du pic K.

a - dépression envahissante

Nous avons appliqué à la surface du bulbe, à 2 mm de l'électrode K-MIS, un petit carré de papier filtre imbibé de K Cl 3 M. Après 2 à 3 min., la K-MIS détecte une élévation de aK qui se stabilise 5 min. plus tard à une valeur correspondant à 15-20 mM. Le temps nécessaire au retour à aK₀ est, alors, d'une vingtaine de minutes mais peut requérir jusqu'à une heure. Dans la majorité des cas, nous n'avons pas pu obtenir de pic K après avoir provoqué une dépression envahissante.

b - Anoxie

Dans le cas de l'anoxie, aK augmente de manière exponentielle jusqu'à atteindre un plateau correspondant à plusieurs dizaines de millimoles en 2 à 3 min. après l'arrêt de la ventilation. L'amplitude de la variation de aK est, alors, voisine de 70 à 80 mM et la stimulation du N.O. ne produit aucune variation supplémentaire de aK.

c - Lésions tissulaires

Nous avons remarqué que le pic se produit toujours au même endroit (glomérule) et avec les mêmes paramètres, même après que nous ayons descendu et remonté l'électrode d'enregistrement de façon à ce qu'elle traverse à plusieurs reprises la couche glomérulaire. Ceci nous permet d'écarter l'éventualité d'une origine du pic liée à une lésion des tissus nerveux traversés par l'électrode.

3 - Influence des ions calcium

L'application de Ca par iontophorèse ne se traduit par aucune altération de aK. Après l'application de Ca, la stimulation du NO se traduit par l'apparition d'un pic K dont les paramètres sont changés comme suit: (Tableau I, Fig. 27)

- L'amplitude est sensiblement réduite (2.50 ± 1.10 mM)
- La latence est accrue (35.88 ± 6.44 sec.)
- La durée n'est pas significativement changée (20.44 ± 2.80 sec.)

4 - Influence des ions cobalt

La stimulation des afférences primaires est nécessaire pour la production du pic K (§ C 1,a). Celui-ci semble dépendre des activités ioniques extracellulaires. Partant de ce fait, nous avons voulu savoir quelles seraient les conséquences d'un blocage de la transmission synaptique et des canaux calciques par des ions cobalt sur le pic K.

L'application iontophorétique de cobalt, avant la stimulation affecte de manière sensible les variations potassiques. Les faibles courants d'application du cobalt (jusqu'à 60-80 nA) ont un effet dépresseur sur l'amplitude du pic K (Fig. 27) sans affecter la variation primaire de manière notable. Les courants plus élevés (> 100 nA) peuvent supprimer totalement le pic K mais ils affectent aussi les variations primaires.

L'application de cobalt par dépôt superficiel sur le bulbe permet d'obtenir les mêmes résultats mais par ce mode d'application nous n'avons pas pu obtenir de gradation des effets du cobalt. De plus, le retour aux conditions normales d'activité permettant d'obtenir des réponses potassiques est compromis par la toxicité du cobalt sur les fibres nerveuses.

Par iontophorèse, les effets du cobalt disparaissent en quelques minutes sans altérer les réponses provoquées ultérieurement; il n'y a donc pas d'empoisonnement par le cobalt aux doses iontophorétiques utilisées.

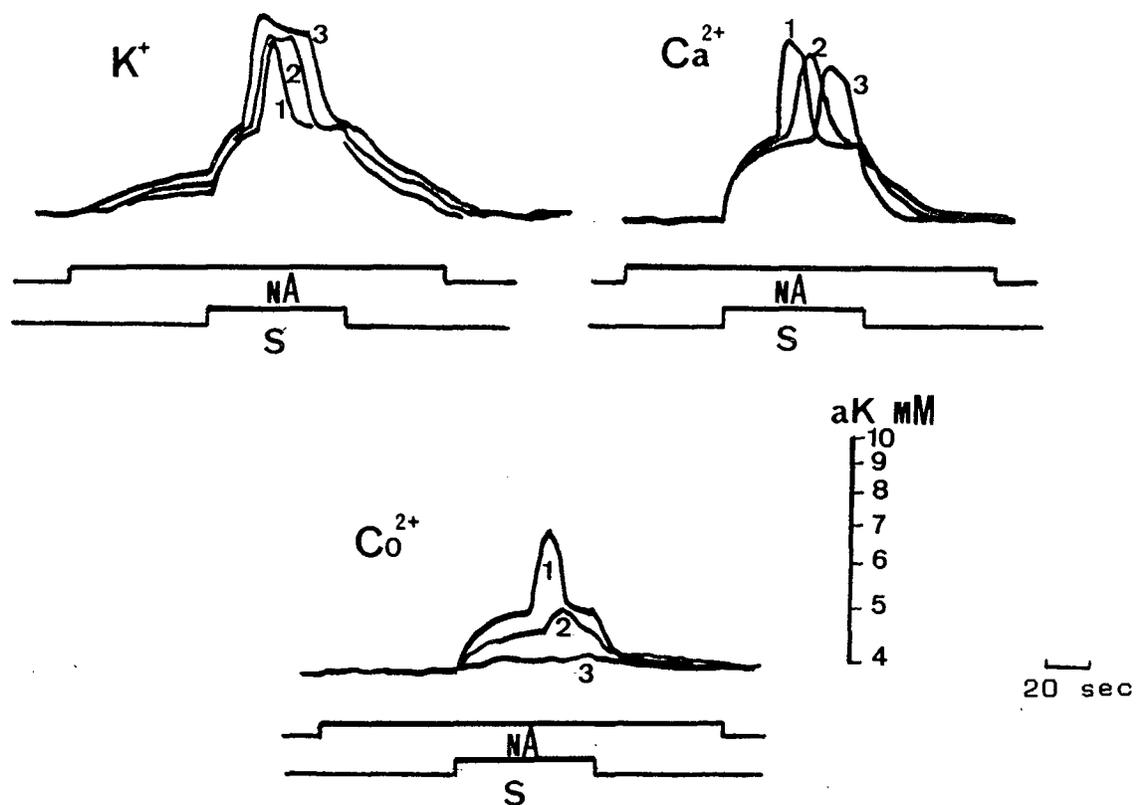


FIGURE 27 :

Effets de l'application iontophorétique de K^+ , de Ca^{++} et de Co^{++} sur les variations potassiques induites par la stimulation du N.O.

L'application de K^+ fait baisser la latence et augmenter l'amplitude et la durée du pic K^+ .

Le Ca^{++} déprime sensiblement le pic K^+ en augmentant la latence et en abaissant l'amplitude.

Le cobalt provoque une augmentation de la latence et une chute de l'amplitude du pic K^+ qui disparaît pour les fortes doses de Co^{++} .

Les courants appliqués sont :

1 : 60 nA

2 : 80 nA

3 : 100 nA

nA : courant d'éjection

S : stimulation électrique.

D- INFLUENCE DES NEUROTRANSMETTEURS

Nous avons réuni dans ce paragraphe tous les résultats concernant les modifications des paramètres du pic K par l'action de différentes substances habituellement rencontrées dans le BO et de quelques antagonistes de ces substances. Une plus large place sera consacrée aux effets du GABA et des GABA-mimétiques dont nous donnerons quelques aspects du mode d'action dans le chapitre III.

1 - Effets du GABA et des GABA-mimétiques sur le pic K

a - GABA

L'application intraglomérulaire de GABA exogène pendant la stimulation du NO se traduit par des effets opposés selon la dose du courant d'éjection. A des doses d'éjection inférieures ou égales à 80 nA, le GABA a un effet facilitateur sur le pic K (Fig. 28); il réduit la latence du pic de manière sensible (- 21 %), réduit légèrement l'amplitude (- 10 %) mais augmente très nettement la durée totale du phénomène (+ 65 %). Les courants d'éjection supérieurs ou égaux à 100 nA produisent un effet inverse sur le délai qui est allongé de 57 % (Tableau II); la durée et l'amplitude étant, quant à elles, pratiquement les mêmes que celles observées avec les faibles courants d'éjection du GABA.

Notons que les courants d'éjection ≥ 100 nA provoquent un retard dans l'apparition de la variation primaire induite par la stimulation du NO. Ceci est dû au fait que le GABA provoque à lui seul une élévation de aK voisine de la millimole pour 100 nA de GABA (voir Chapitre III), ce qui masque quelque peu l'élévation primaire provoquée par la stimulation.

b - Bicuculline

Nous avons essayé d'antagoniser les effets du GABA par l'application simultanée de bicuculline et de GABA au sein du glomérule. La figure 28 montre que l'application de 100 nA de GABA et de 80 nA de bicuculline se traduit par une suppression des effets dépresseurs du GABA et par une réduction de la latence du pic K (- 24 %), la durée du pic étant sensiblement accrue (+ 25 %) et l'amplitude inchangée par rapport au témoin (Tableau II.)

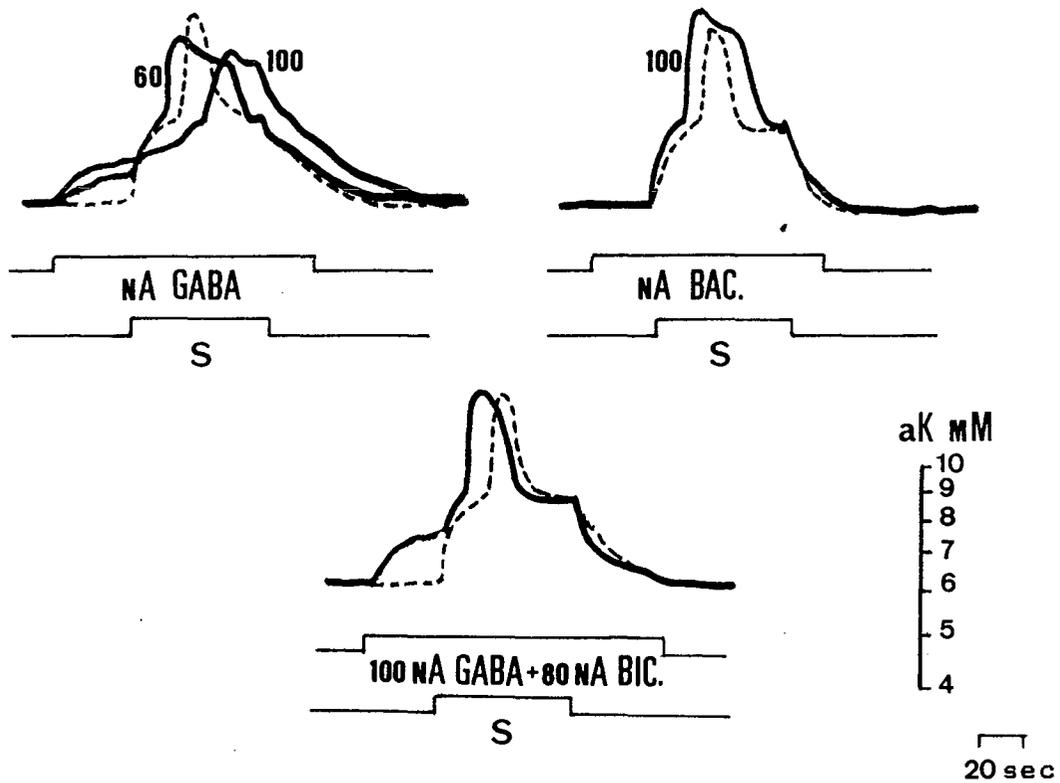


FIGURE 28 :

Effets de l'application iontophorétique de GABA, de bicuculline (BIC.) et de baclofène (BAC.) sur le pic K^+ provoqué par la stimulation (S) du N.O.

Le tracé témoin est représenté en trait discontinu.

GABA : 60, 100 nA

BIC. : bicuculline 80 nA

BAC. : baclofène 100 nA

c- Baclofène

L'application intraglomérulaire de baclofène, un agoniste du GABA, modifie les paramètres du pic de la même manière quelle que soit l'intensité du courant d'éjection. Par exemple, un courant de 100 nA (Fig. 28) provoque une augmentation sensible de l'amplitude du pic (+ 13 %), une réduction de la latence (- 39 %) et un allongement (+ 62 %) de la durée (Tableau II.)

Solutions éjectées	Latence (sec.)	Durée (sec.)	Amplitude (mM)
Témoins (n = 33)	21.90 ± 5.50	21.60 ± 5.80	3.04 ± 1.05
Baclofène (n = 10) 100 nA	13.40 ± 2.34	35.10 ± 3.50	3.46 ± 0.70
GABA < 80 nA (n=10)	17.71 ± 2.91	35.80 ± 3.02	2.77 ± 0.60
GABA > 100 nA (n=10)	34.40 ± 7.08	34.80 ± 7.70	2.68 ± 0.94
GABA100nA+ Bicuculline 80 nA (n=10)	16.50 ± 1.50	27.00 ± 3.00	3.10 ± 0.98

TABLEAU II. Influence de l'application iontophorétique de GABA, de baclofène et de bicuculline sur le pic K induit par la stimulation du NO. Les valeurs représentent la moyenne ± E.S. Le nombre de tests est indiqué entre parenthèses pour chaque substance.

2- Effets de la dopamine et de l'halopéridol

a- Dopamine

La coexistence au niveau glomérulaire d'influences GABA-ergiques et dopaminergiques (voir INTRODUCTION) nous a amené à tester l'influence de l'application intraglomérulaire de dopamine sur les caractéristiques du pic K.

L'application iontophorétique de dopamine (≤ 80 nA) se traduit par une nette réduction de l'amplitude du pic K (- 41 %) et par un allongement de la latence (+ 71 %), la durée étant peu affectée (Fig. 29.). Pour des courants allant de 150 à 200 nA, la dopamine provoque également une réduction de l'amplitude du pic K (- 35 %) mais un allongement (+ 67 %) de la durée et une réduction (- 23 %) de la latence (Tableau III.)

b - Halopéridol

L'application iontophorétique d'halopéridol (Haldol ®) qui occupe les sites récepteurs de la dopamine se traduit par des effets inverses à ceux observés lors de l'application de dopamine. En effet, l'halopéridol a un effet facilitateur sur le pic K (Fig. 29). Par exemple, l'application de 60 nA d'halopéridol provoque une réduction de la latence (- 25 %), un allongement (+ 51 %) de la durée et une très légère augmentation de l'amplitude (+ 7 %). Pour un courant d'éjection de 100 nA ces effets sont accentués (Fig. 29; Tableau III.)

c - GABA + dopamine

L'application simultanée de GABA et de dopamine (80 nA) provoque une dépression totale du pic K⁺ et une réduction très importante de la variation primaire qui n'est plus alors que de 0.6 à 0.7 mM (Fig. 29).

Solutions éjectées	Latence (sec.)	Durée (sec.)	Amplitude (mM)
Témoins (n = 33)	21.90 ± 5.50	21.60 ± 5.80	3.04 ± 1.05
DA, 80 nA (n = 10)	37.40 ± 3.80	23.10 ± 2.90	1.79 ± 0.83
DA, 150 nA (n = 10)	16.80 ± 4.30	36.00 ± 5.70	1.97 ± 0.72
Halopéridol (n = 10)	16.40 ± 3.70	32.60 ± 6.10	3.25 ± 0.30
5,HT 80 nA (n = 10)	11.20 ± 4.20	31.70 ± 2.50	3.95 ± 0.80
5,HT 200 nA (n = 10)	23.40 ± 4.70	22.70 ± 3.20	1.82 ± 0.60

TABLEAU III: Influence de l'application iontophorétique de dopamine (DA), d'halopéridol et de sérotonine (5,HT) sur les paramètres du pic K⁺; Valeurs moyennes ± E.S.

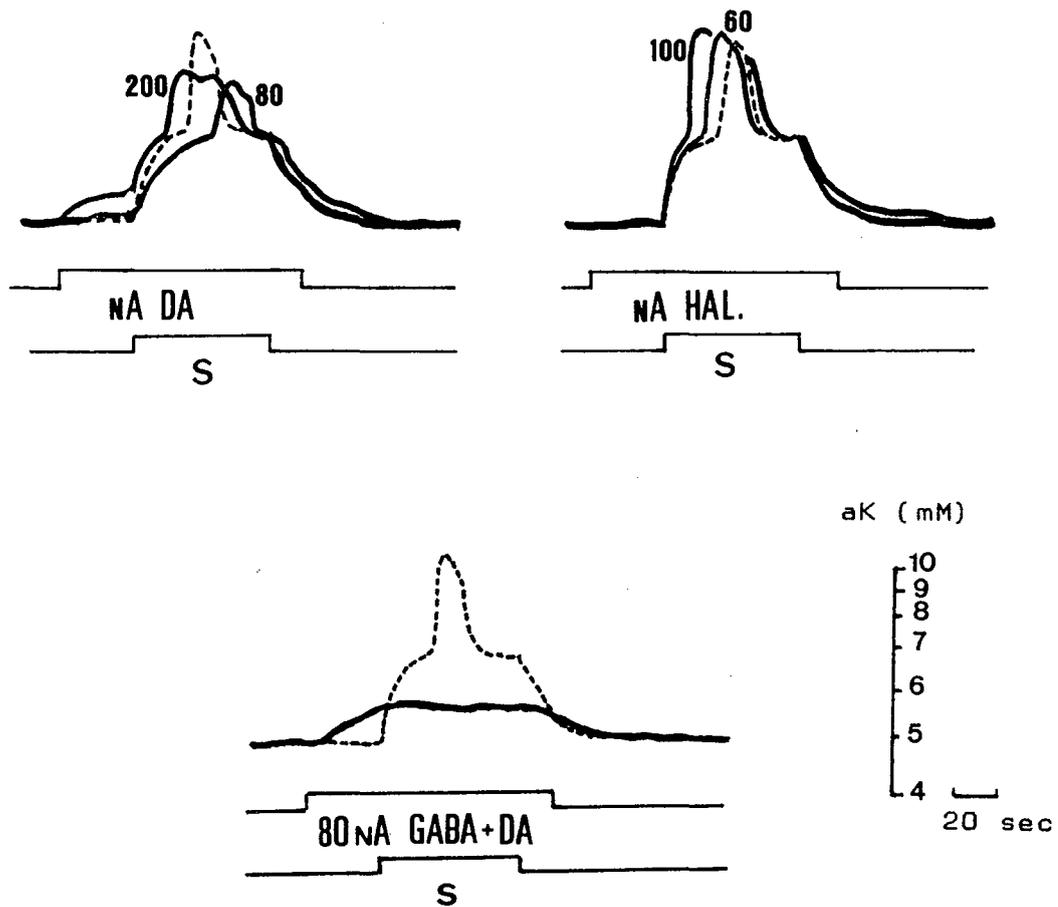


FIGURE 29 :

Effets de l'application iontophorétique de dopamine (DA), d'halopéridol (HAL.) et de GABA + DA sur le pic K^+ provoqué par la stimulation (S) du N.O.

Le tracé témoin est représenté en trait discontinu.

3- Effets de la sérotonine

Certains travaux (voir INTRODUCTION) ont mis en évidence la présence d'importantes quantités de sérotonine dans le glomérule et dans la région périglomérulaire. C'est pour cette raison que nous avons appliqué iontophorétiquement de la sérotonine dans le glomérule tout en enregistrant les modifications des paramètres du pic K induit par la stimulation du NO.

Pour un courant d'éjection de 80 nA, la sérotonine provoque une augmentation de l'amplitude du pic K (+ 30%, Fig. 30; Tableau III.) ainsi, qu'une réduction (- 50%) de la latence et un allongement de la durée (+ 47%). Pour un courant de 200 nA l'effet est inversé car nous observons une baisse de l'amplitude du phénomène (- 40%), la latence et la durée étant pratiquement inchangées.

4- Effets de la carnosine

La voie afférente au BO contient, selon certains résultats (voir INTRODUCTION), d'importantes quantités de carnosine. Nos tests concernant l'action de la carnosine sur le pic K ont donné des résultats assez ambigus. En effet, l'application iontophorétique de carnosine dans le glomérule se traduit, selon les essais, par des effets aussi bien facilitateurs que dépresseurs vis-à-vis du pic K.

5- Effets de l'insuline

Le bulbe olfactif du rat contient de nombreux récepteurs à insuline (HALASZ et SHEPHERD, 1983.). De plus, la méthode de marquage au 2- désoxyglucose (JOURDAN *et al*, 1980) a mis en évidence un marquage intense des glomérules à la suite d'une stimulation odorante intense. Il y a alors une mobilisation d'importantes quantités de glucose à ce niveau. Partant de ces faits, nous avons voulu savoir si l'injection d'insuline pouvait influencer l'apparition du pic K en modifiant le taux de glucose sanguin.

L'injection intrapéritonéale d'insuline (40 U.I.) n'altère pas aK₀ mais la stimulation du NO provoque une variation de aK en un seul temps dont l'amplitude est supérieure ou égale au total de la variation primaire et du pic d'une réponse témoin (Fig. 30.). Nous n'observons plus alors de pic K proprement dit, même si l'amplitude de la variation de aK est assez

importante (6 à 7 mM). Après l'injection d'insuline, le retour vers les conditions normales de production d'un pic K nécessite un temps allant de 30 à 40 min.

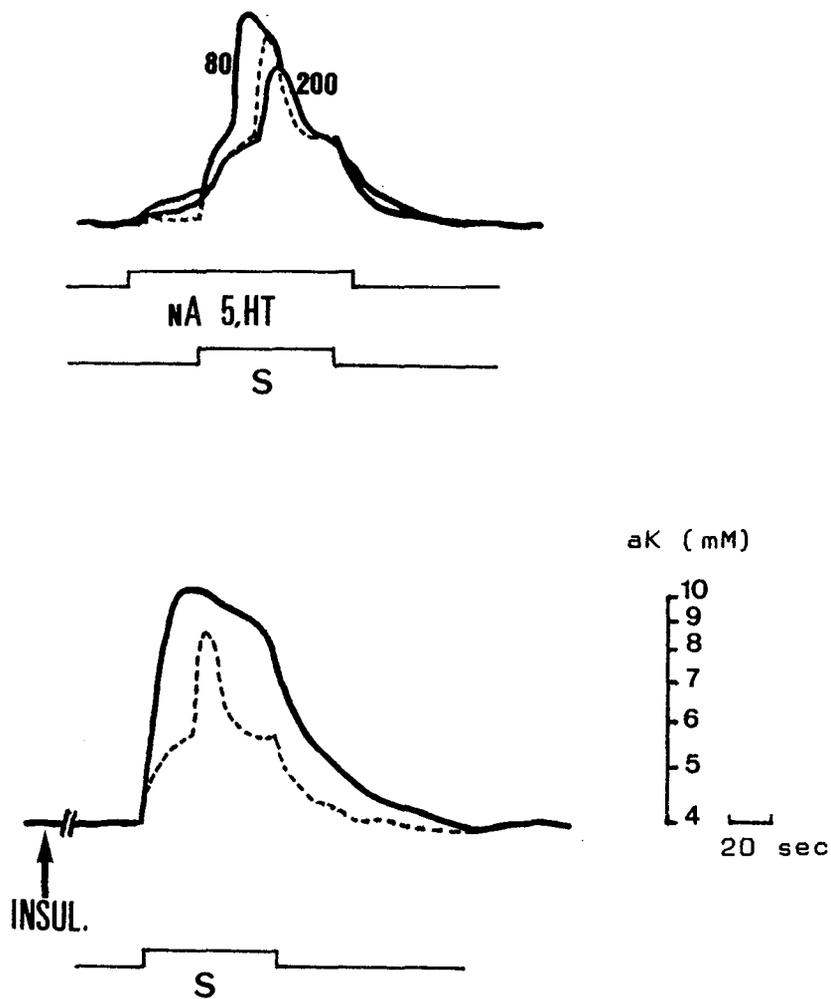


FIGURE 30 :

En haut: Effets de l'application iontophorétique de sérotonine (5,HT) sur le pic K^+ provoqué par la stimulation (S) du N.O.

*En bas: Effets de l'injection intrapéritonéale d'insuline (INSUL. 40 U.I.) trois minutes avant la stimulation du N.O.
Le tracé témoin est représenté en trait discontinu.*

E- RELATIONS ENTRE LES VARIATIONS POTASSIQUES ET LES MOUVEMENTS CALCIQUES DANS LA COUCHE GLOMERULAIRE.

1- Détermination de l'activité calcique extracellulaire

A l'aide d'électrodes Ca-MIS (voir MATERIELS et METHODES), nous avons déterminé les valeurs de l'activité calcique extracellulaire (aCa) dans les différentes couches bulbaires. Dans la couche glomérulaire, une valeur moyenne de 1.0 ± 0.1 mM (n = 12) a été mesurée; la aCa n'étant pas significativement différente dans les autres couches bulbaires.

2- Enregistrement simultané des variations potassique et calcique.

Pour étudier l'incidence des stimulations du NO sur les activités potassique et calcique, nous nous sommes mis dans les mêmes conditions expérimentales que celles permettant d'enregistrer un pic K (voir Chapitre II, § A). A l'aide de deux électrodes Ca-MIS et K-MIS accolées et placées dans la couche glomérulaire, nous avons enregistré simultanément les réponses calcique et potassique à la stimulation du NO (Fig. 31.). Comme le montre la figure 32, A, le début de la stimulation (6 V, 50 Hz pendant 60 sec.) s'accompagne d'une élévation de aK, déjà décrite plus haut, et d'une chute de aCa dont l'amplitude est de 0.3 ± 0.1 mM. Ensuite, l'apparition du pic K s'accompagne de la formation d'un pic Ca de signe inverse par rapport au pic K et dont l'amplitude est de 0.45 ± 0.15 mM (n = 12.)

L'examen des latences respectives mesurées en faisant défiler l'enregistreur à grande vitesse, fait apparaître que la variation de aCa débute avec un certain retard (1 à 2 sec.) par rapport au pic K et que le maximum de la réponse Ca n'est atteint que pendant la phase descendante du pic K (Fig. 32, A.) soit avec un retard moyen de 6 secondes

Rappelons que le temps de réponse des électrodes Ca-MIS n'est pas responsable du retard du pic Ca par rapport au pic K car nos essais *in vitro* par application de doses iontophorétiques de Ca ou de K montrent que les électrodes Ca-MIS et K-MIS ont des temps de réponse allant de 0.1 à 0.2 sec.

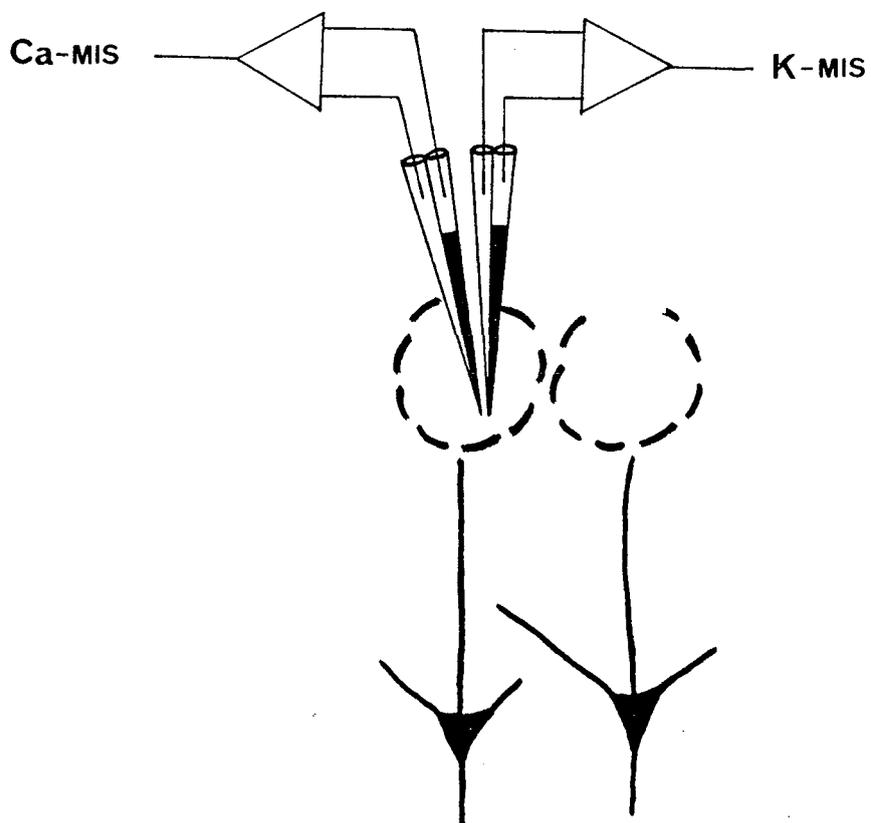


FIGURE 31 :

Schéma de la position de l'assemblage K-MIS / Ca-MIS dans le glomérule permettant d'enregistrer simultanément les variations potassiques et calciques en réponse à la stimulation du N.O.

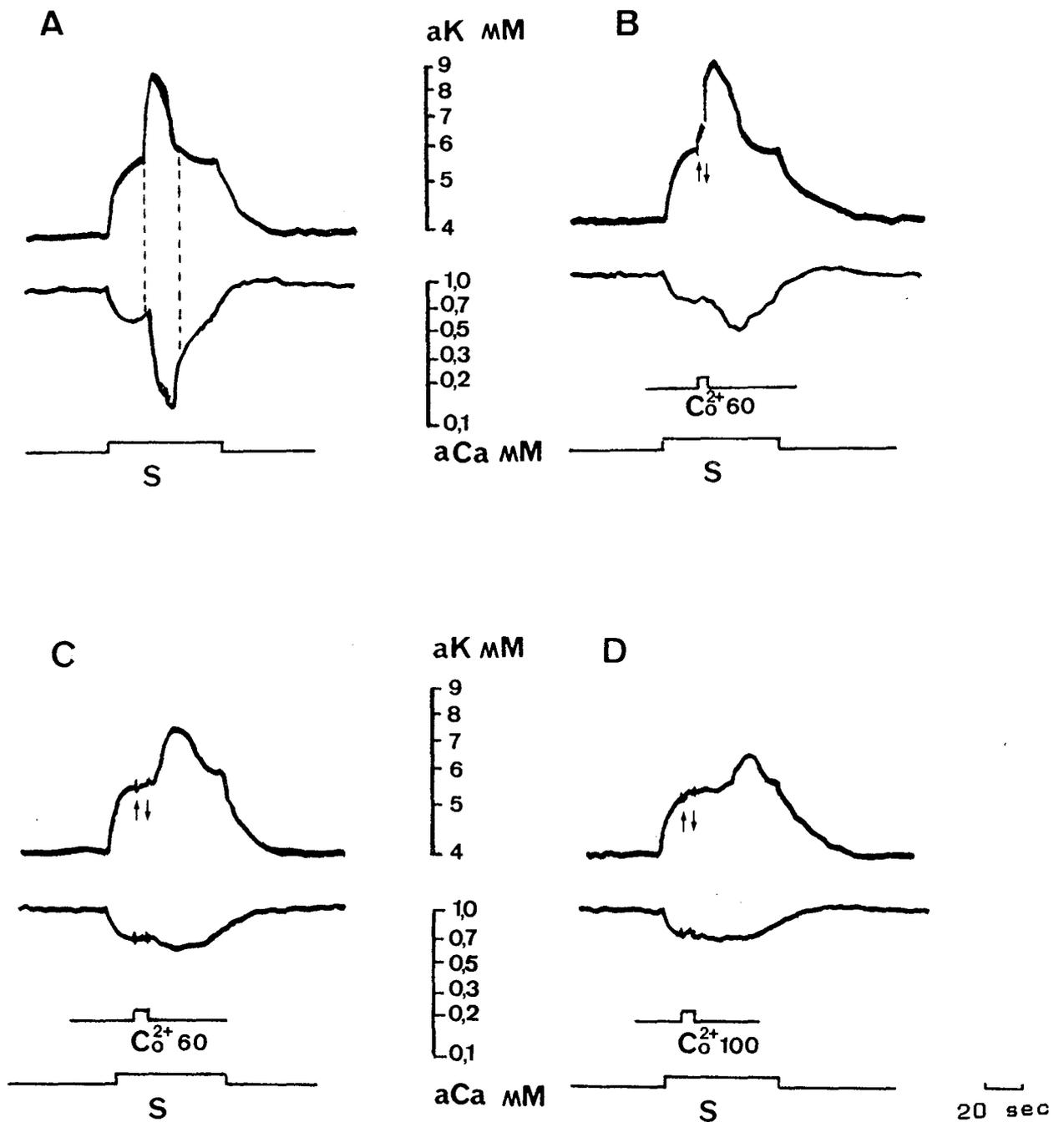


FIGURE 32:

Variations potassiques et calciques en réponse à la stimulation du N.O.

A - Enregistrement simultané des deux pics K^+ et Ca^{++} montrant le décalage entre les deux pics (trait discontinu).

B - Influence de l'application de 60 nA Co^{++} au moment de l'apparition du pic K^+ .

C et D : Influence du Co^{++} appliqué juste avant l'apparition du pic K^+ .

Pour examiner plus en détail les relations susceptibles d'exister entre les deux pics, nous avons procédé à l'application iontophorétique d'agents pouvant influencer les mouvements calciques.

3- Influence des ions calcium

L'application iontophorétique de calcium se traduit, comme nous l'avons vu plus haut, par une réduction sensible de l'amplitude du pic K et d'un accroissement de sa latence (voir Fig. 27.). En ce qui concerne les réponses calciques (variation primaire et pic Ca), elles sont réduites par l'application de courants d'éjection du Ca allant de 30 à 60 nA et totalement supprimés par des courants de 80-100 nA provoquant une élévation de aCa de 1.5 ± 0.5 mM (Fig. 33.) .

4- Influence des ions cobalt

Nous avons vu dans ce chapitre (§ C.-4) que l'application iontophorétique de cobalt peut, selon l'intensité du courant d'éjection, altérer partiellement ou supprimer totalement le pic K. Pour comprendre les relations liant le pic K au pic Ca, nous avons appliqué le cobalt pendant des temps très courts (2 à 3 sec.) juste avant ou pendant la formation du pic K.

L'application de 60 nA Co (Fig. 32, B) lors de la formation du pic K affecte principalement le pic Ca dont l'amplitude est réduite de 33 %; le pic K étant peu affecté.

Lorsque l'application de cobalt (60 nA) précède l'apparition du pic K (Fig. 32, C) l'altération du pic Ca est plus nette (baisse de l'amplitude de 80 %) et la formation du pic K est retardée (latence accrue de 40 %) et déprimée (amplitude réduite de 32 %). Ces effets sont accentués par l'accroissement du courant d'éjection. Ainsi, pour un courant de 100 nA Co (Fig. 32, D) le pic Ca est totalement supprimé et le pic K présente une latence deux fois supérieure au témoin et une amplitude réduite de 67 % .

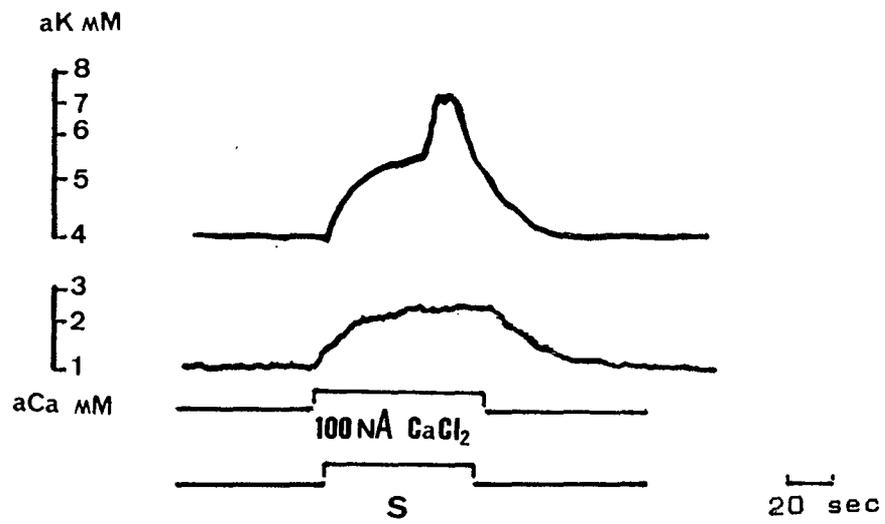


FIGURE 33 :

Influence de l'application iontophorétique de Ca Cl₂ (100 nA) sur les réponses potassiques et calciques induites par la stimulation (S) du N.O.

F- ETUDE COMPARATIVE DE LA DIFFUSION DU K DANS LES COUCHES GLOMERULAIRE ET PLEXIFORME

Les lois de diffusion des ions dans les tissus nerveux ont été définies par CURTIS *et al* (1960) et affinées pour le potassium par NICHOLSON *et al* (1979; voir INTRODUCTION.). Le but de cette étude est de vérifier si la diffusion du K dans les différentes couches bulbaires se fait de manière uniforme et selon ces lois de diffusion .

1 - Evaluation théorique

La quantité de potassium diffusant à partir d'une source iontophorétique située à environ 100 μm de l'électrode de lecture peut être évaluée à partir des courbes de diffusion obtenues en appliquant l'équation de NICHOLSON (voir Fig 34), elle est de l'ordre de 0.25 à 0.3 mM pour un courant d'éjection de 100 nA. Pour une distance source-électrode comprise entre 6 et 10 μm , cette valeur varie entre 2 et 4 mM environ.

2 - Diffusion du K dans la couche glomérulaire

L'assemblage d'électrodes utilisé dans le cas présent comporte : l'électrode K-MIS à laquelle est accolée une micropipette d'iontophorèse, cette pipette constitue la source proximale de potassium (Fig. 35). Une seconde pipette d'iontophorèse accolée à la K-MIS mais à une distance de pointe à pointe de 100 μm constituant la source distale de K, complète l'assemblage. Cet assemblage est inséré dans la couche glomérulaire à une profondeur de 200 à 230 μm , zone où se produit le pic K.

L'application d'un courant d'éjection de 100 nA à la source proximale de K provoque une élévation de aK de 4.2 ± 0.7 mM (n = 12) au niveau de la K-MIS. La figure 41 montre que la valeur de cette élévation de aK est proportionnelle à la valeur du courant d'éjection.

L'application d'un courant de 100 nA à la source distale ne provoque qu'une très légère variation de aK (0.06 ± 0.04 mM). Cette valeur est très inférieure à la valeur théorique (voir Fig. 34). Les courants supérieurs à 800 nA provoquent dans la moitié des tests (n = 6) une plus importante élévation de aK (0.59 ± 0.22 mM) et une légère baisse de aK

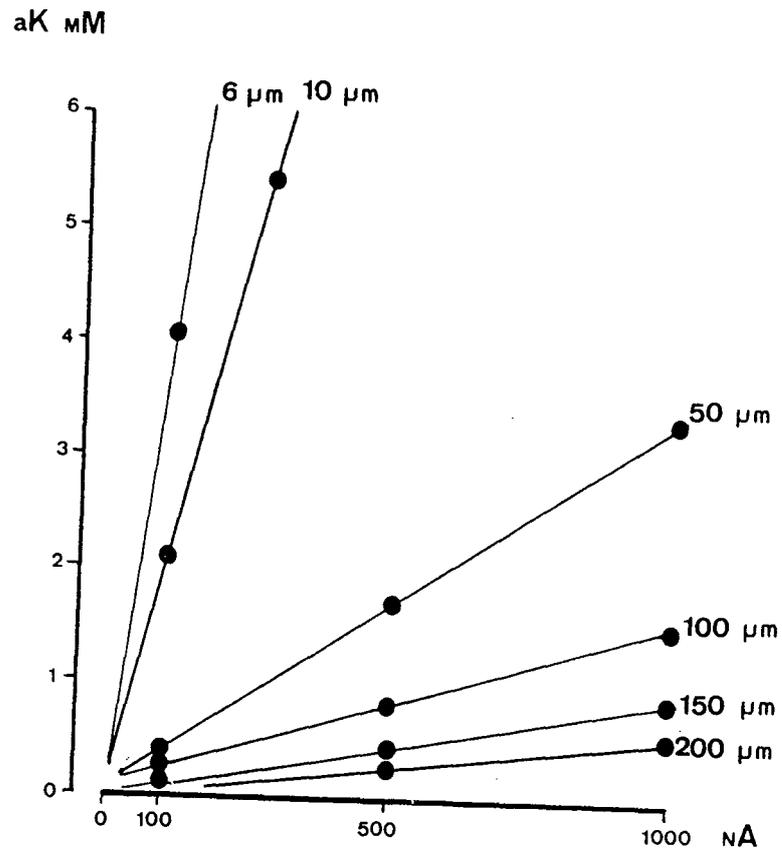


FIGURE 34 :

Courbes donnant la quantité de potassium (mM) libérée par iontophorèse dans le voisinage d'électrodes K-MIS. Les valeurs théoriques moyennes sont données en fonction du courant d'éjection (nA) et de la distance (μm) de la source iontophorétique par rapport à la K-MIS.

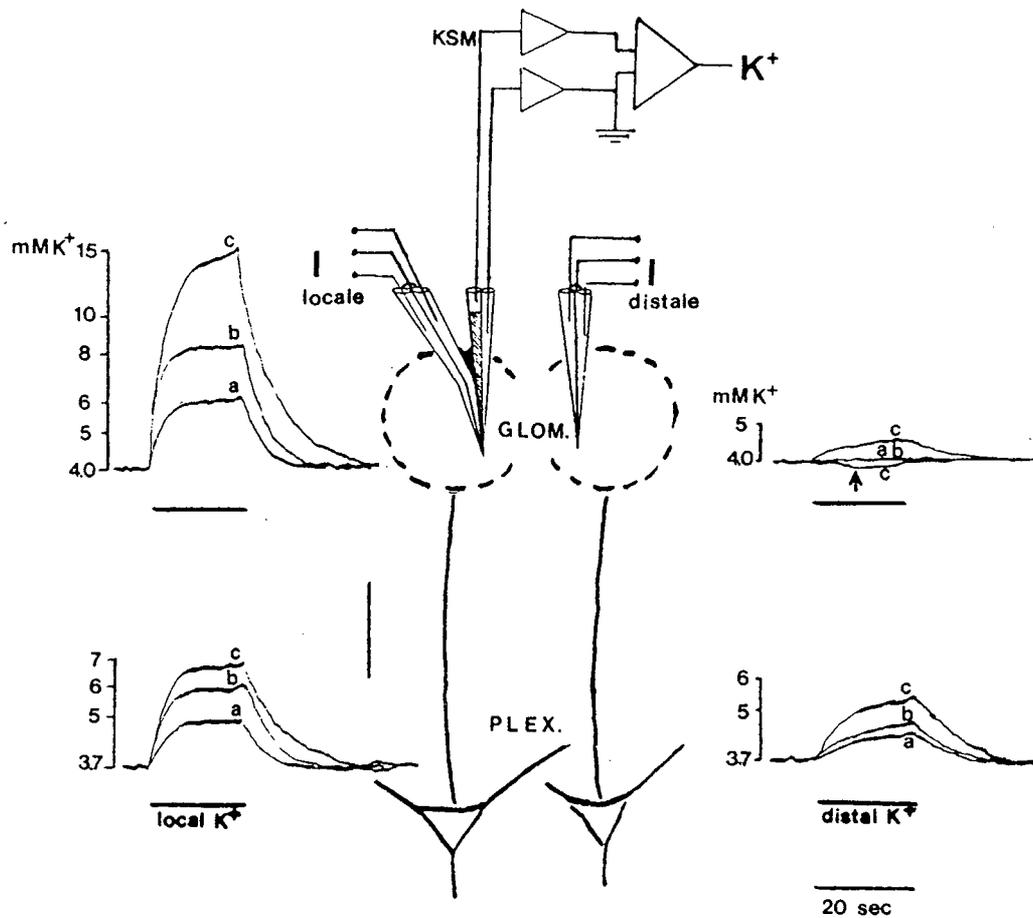


FIGURE 35 :

Variations de aK en réponse à l'application de KCl à partir d'une source distale et d'une source proximale au niveau des couches glomérulaire (GLOM.) et plexiforme externe (PLEX.).

Les variations de aK ont été enregistrées au niveau proximal.

Le schéma du milieu montre la position des électrodes révélée par les contrôles histologiques (imprégnation argentique) quand celles-ci sont logées dans la couche glomérulaire.

Barre verticale : 100 μm .

I locale, I distale : sources iontophorétiques.

a, b et c représentent les courants d'éjection; a : 60 nA, b : 100 nA, c : 800 nA.

(0.1 ± 0.05 mM) dans le reste des tests. La baisse de aK, quand elle a lieu, survient 5 sec environ après le début de l'application du courant d'éjection (voir Fig. 35, GLOM. c, flèche).

3 - Diffusion du K dans la couche plexiforme externe

Afin de vérifier si la diffusion du K exogène se fait de la même manière dans les autres couches bulbaires nous avons implanté l'assemblage d'électrodes utilisé plus haut en dessous d'une profondeur de $250 \mu\text{m}$, limite supérieure de la couche plexiforme externe. Les réponses de la K-MIS à l'éjection de potassium proximal ont une amplitude inférieure à celles obtenues dans la couche glomérulaire comme nous pouvons le voir sur la figure 35. Ainsi, un courant de 100 nA appliqué à la source proximale provoque une élévation de aK dont l'amplitude est de 2.63 ± 0.64 mM. L'augmentation de l'intensité du courant d'éjection n'accroît pas autre mesure l'amplitude de l'élévation de aK comme c'est le cas plus haut. L'application de K à partir de la source distale provoque une élévation de aK de 0.55 ± 0.16 mM ($n = 12$) pour un courant de 100 nA. Rappelons que dans la couche glomérulaire, il faut appliquer un courant supérieur à 800 nA pour obtenir une telle variation de aK et que celle observée au niveau glomérulaire pour un courant de 100 nA est pratiquement négligeable (0.06 ± 0.04 mM).

4- Effets de l'ouabaïne

Pour déterminer l'éventuelle existence d'une relation entre l'absence de diffusion de K dans la couche glomérulaire et les phénomènes actifs de réabsorption du K, nous avons procédé à des applications proximales et/ou distales d'ouabaïne. Celles-ci se traduisent par de profondes modifications de la diffusion du K dans les deux couches glomérulaire et plexiforme.

Dans la couche glomérulaire, l'application, à partir de la source proximale, de 100 nA de K + 100 nA d'ouabaïne se traduit par un accroissement de la valeur de la variation de aK (Fig. 36); Celle-ci est alors, de 9.1 ± 0.8 mM contre 4.2 ± 0.7 mM pour le témoin sans ouabaïne. En ce qui concerne la source distale, l'application d'ouabaïne et de K provoque au niveau de la K-MIS, une importante élévation de aK (5.65 ± 1.3 mM) contre 0.06 ± 0.04 mM pour le témoin sans ouabaïne (voir Fig. 36).



FIGURE 36 :

Influence de l'application iontophorétique d'ouabaine sur la diffusion du K^+ .

Dans la couche glomérulaire, l'ouabaine amplifie la réponse au K^+ proximal et provoque, après un délai de 5 sec (flèche), la diffusion du K^+ distal.

Dans la couche plexiforme, aucun délai n'a été observé pour la diffusion du K^+ distal.

Le temps de retour à l'activité de base est allongé après l'application d'ouabaine.

Les abréviations sont les mêmes que celles de la figure 35.

Dans la couche plexiforme, les réponses de la K-MIS à l'application de K proximal ou distal sont également amplifiées en présence d'ouabaine. Nous enregistrons ainsi des variations de 6.3 ± 0.4 et 4.3 ± 0.6 mM respectivement pour l'application proximale et distale d'ouabaine et de potassium.

Il faut noter que dans la couche glomérulaire, la stimulation de la diffusion de potassium distal par l'ouabaine n'est détectée par la K-MIS que 5 secondes après le début de l'application de K distal. Notons aussi que l'application d'ouabaine n'affecte pas aK de repos (aKo) aux doses utilisées, mais retarde le retour vers aKo après application de K (voir Fig. 36).

G - EVALUATION BIOCHIMIQUE DU TAUX DE PROTEINES ET DE L'ACTIVITE Na,K-ATPASIQUE BULBAIRES

Compte-tenu des résultats obtenus en étudiant la diffusion du K dans les espaces extracellulaires bulbaires (voir plus haut), nous avons voulu savoir quelle était la cause de l'absence de diffusion de K dans la couche glomérulaire. Pour ce faire, nous avons procédé à l'évaluation du contenu protéique et des activités enzymatiques à la fois dans la zone glomérulaire et dans les couches profondes. La procédure utilisée a consisté en un isolement des tissus des deux zones (voir MATERIELS et METHODES).

1 - Détermination du contenu protéique.

Le taux de protéines a été déterminé séparément dans les deux zones superficielle et profonde. La détermination a été faite aussi bien dans les homogénats totaux que dans les fractions microsomales préparées à partir des tissus de ces deux zones.

Dans les homogénats totaux, le taux de protéines (exprimé en mg / g tissu) dans la fraction tissulaire superficielle (couche du nerf olfactif et couche glomérulaire) est supérieur de 38 % à celui des couches profondes (voir tableau IV).

Dans les fractions microsomales, la différence entre les taux protéiques mesurés dans les deux zones bulbaires s'accroît davantage. En effet, le contenu protéique de la zone superficielle est supérieur de 127 % à celui de la zone profonde (Tableau IV, Fig. 38).

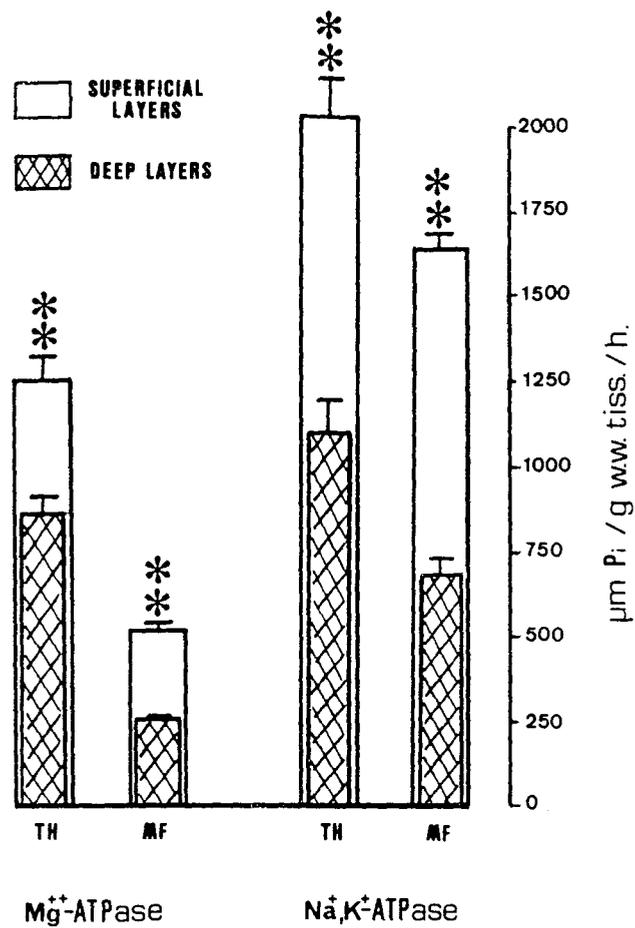


FIGURE 37 :

Activités Na,K-ATPasiques et Mg-ATPasiques totales mesurées dans les homogénats totaux (TH) et les fractions microsomales (MF) préparés à partir de tissus des couches superficielles et profondes du B.O.

Chaque histogramme représente l'activité moyenne \pm E.S. pour $n = 3$.

Les calculs statistiques ont été réalisés en utilisant le t de Student.

** : $p < 0.01$; ** : $p < 0.001$.*

	PROTEINES mg/g tissu	Mg-ATPases μ mole Pi/g tissu/h	Na,K-ATPases μ mole Pi/gtissu/h.
HOMOGÉNATS TOTAUX			
Couches superficielles	164.19 \pm 8.31	1254 \pm 74	2035 \pm 110
Couches profondes	119.12 \pm 2.01	880 \pm 47	1097 \pm 96
FRACTIONS MICROSOMALES			
Couches superficielles	57.76 \pm 4.60	510 \pm 26	1636 \pm 48
Couches profondes	25.39 \pm 1.29	257 \pm 08	670 \pm 45

TABLEAU IV : Contenu protéique et activités enzymatiques totales déterminées dans les tissus de couches superficielles et profondes Moyennes \pm E.S (n = 3).

2 - Activités Mg-ATPasiques

a - Activité totale

L'activité Mg-ATPasique brute exprimée en μ mole Pi / g tissu / heure et déterminée dans les homogénats totaux des deux zones est supérieure de 54 % dans la zone superficielle (Tableau IV, Fig. 37). La même détermination effectuée dans la fraction microsomale montre une différence de 98 % entre les deux zones.

b - Activité spécifique

Nous avons rapporté l'activité totale de l'enzyme au taux de protéines mesuré précédemment ce qui nous donne l'activité spécifique. Dans ce cas, l'expression est par μ mole Pi/mg protéine /heure. Comme le montre le tableau V et la figure 38, les différences entre les deux niveaux

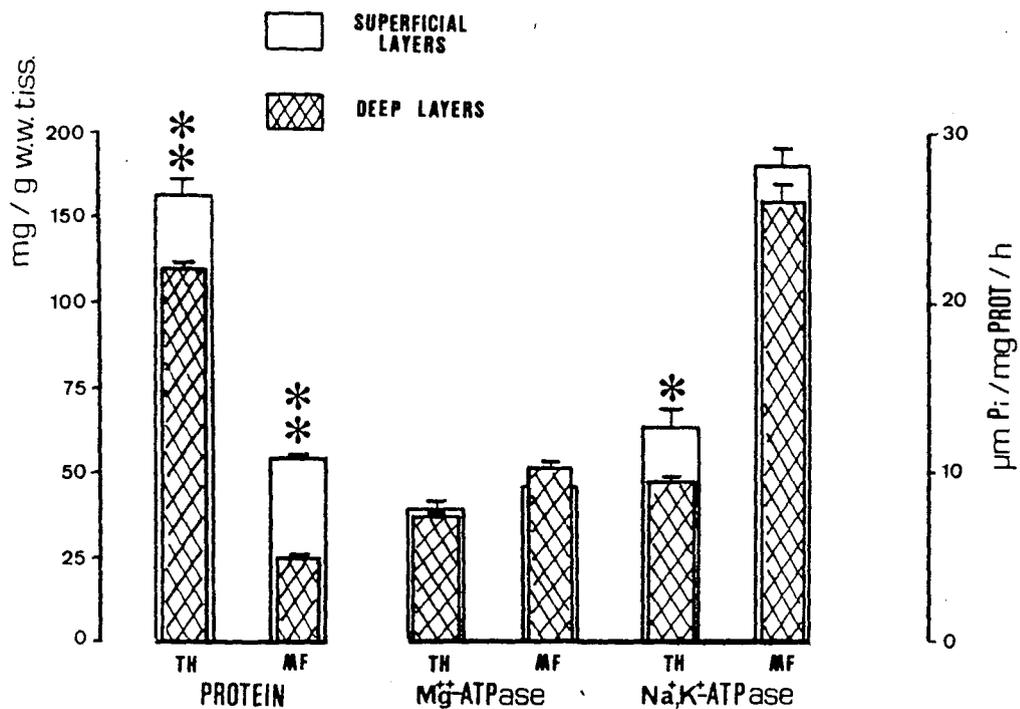


FIGURE 38 :

Contenu protéique et activités Na,K- et Mg-ATPasiques SPECIFIQUES dans les homogénats totaux (TH) et les fractions microsomales (MF) préparés à partir des tissus des couches superficielles et profondes.

* : $p < 0.01$; ** : $p < 0.001$.

s'estompent et ne laissent plus apparaître d'écart significatifs entre les activités Mg - ATPasique mesurées dans les deux zones.

	Mg-ATPases $\mu\text{mole Pi/mg Prot/h.}$	Na,K-ATPases $\mu\text{mole Pi/mg prot/h.}$
	H O M O G E N A T S	T O T A U X
Couches sup. (n = 3)	7.65 ± 0.44	12.40 ± 1.14
Couches prof. (n=3)	7.39 ± 0.30	9.21 ± 0.67
	F R A C T I O N S	M I C R O S O M A L E S
Couches sup. (n = 3)	8.82 ± 0.51	10.12 ± 0.72
Couches prof. (n = 3)	28.32 ± 1.08	26.38 ± 1.16

TABLEAU V : Activités enzymatiques spécifiques déterminées dans les tissus des couches superficielles et profondes (prof.). Moyennes \pm E.S.

3 - Na, K - ATPases

a - Activité totale

Comme pour la Mg - ATPase, la détermination de l'activité Na, K-ATPasique brute montre d'importants écarts entre les valeurs mesurées dans les deux zones bulbaires. Ainsi, l'activité Na, K-ATPasique est-elle supérieure de 85% dans les couches superficielles quand la détermination est faite dans l'homogénat total.

Dans les fractions microsomales, la différence s'accroît montrant que l'activité enzymatique est supérieure de 144% dans les couches superficielles (Fig 38).

b - Activité spécifique

Rapportées au taux de protéines, ces activités Na, K-ATPasique dans les deux zones sont alors exprimées en $\mu\text{moles Pi/ mg protéines/ heure}$ (tableau V). Dans ce cas, les écarts se réduisent de manière significative; en effet, l'activité spécifique de l'enzyme ne montre plus que des écarts de 34% dans l'homogénat total et de 7% dans la fraction microsomale (Fig. 38). Cette différence de 7% est considérée comme non significative.

4 - Contrôle histologique

Nous avons utilisé des BO auxquels nous avons partiellement enlevé la couche du nerf olfactif et la couche glomérulaire sur la partie dorso-latérale, le reste des BO étant intact pour pouvoir juger de la qualité du pelage des bulbes. Comme le montre la figure 39, l'isolement des couches superficielles se fait sans grande contamination par les tissus des couches profondes.

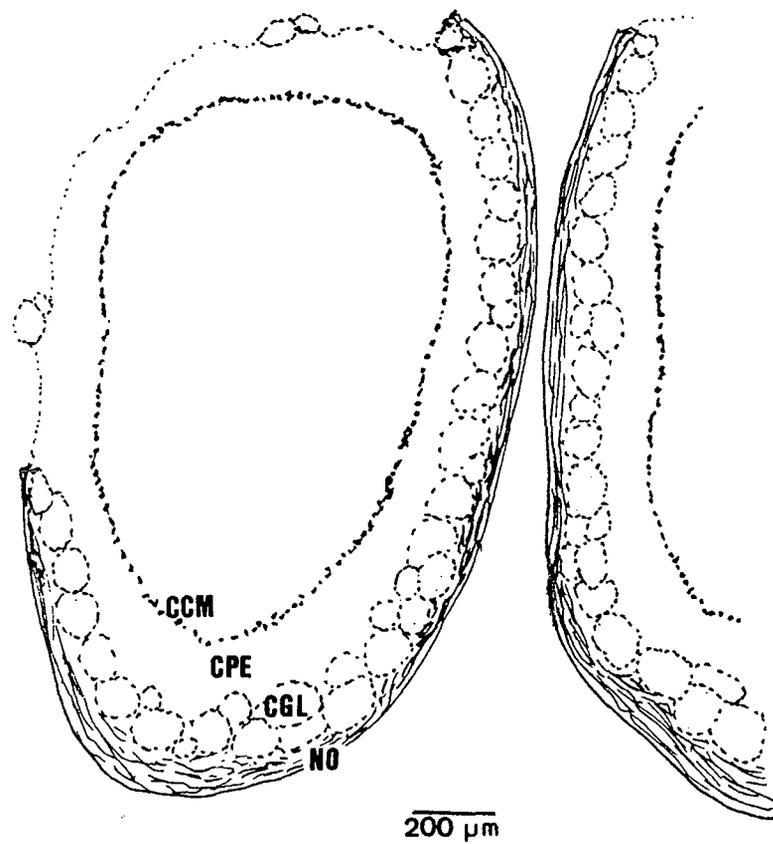


FIGURE 39:

Dessin en camera lucida à partir d'une coupe de bulbe olfactif dont la couche du N.O. et la couche glomérulaire ont été enlevées par endroits. Les abréviations sont les mêmes que celles de la figure 2.

II- ETUDE ONTOGENETIQUE DE L'ACTIVITE DANS LE BULBE OLFACTIF DU RAT - EVOLUTION DE L'INHIBITION GABA-ERGIQUE.

RESULTS

Avant d'aborder l'inhibition de l'activité bulbaire par le GABA, nous avons procédé à l'évaluation de l'activité potassique de base et de la fréquence des potentiels extracellulaires dans le bulbe olfactif. Nous avons évalué ces activités témoins chez des rats de différents âges et dans plusieurs zones bulbaires.

A- DETERMINATION DE L'ACTIVITE POTASSIQUE EXTRACELLULAIRE

L'activité potassique extracellulaire (aKo) diminue au cours de la période postnatale jusqu'à ce qu'elle se stabilise à une valeur moyenne de 3 mM à la fin de la troisième semaine de vie postnatale. A cet âge la aKo d'adulte est atteinte et n'évolue plus de manière significative par la suite.

1- Période périnatale

La aKo est nettement plus élevée chez le rat nouveau-né que chez le rat adulte. A la naissance et jusqu'au 2^e jour de vie PN la aKo moyenne est de 7.0 ± 0.4 mM, $n = 35$ (Fig. 40). Au 7^e jour PN, une baisse significative de aKo est constatée; elle n'est plus, alors, que de 5.1 ± 0.1 mM. Il est à noter que ces valeurs moyennes ne fluctuent pas de manière significative en fonction de la profondeur de la K-MIS.

Durant la deuxième semaine de vie postnatale nous avons mesuré une activité potassique moyenne de 4.4 ± 0.2 mM. Cependant, au niveau d'une zone comprise entre -150 et -300 μ m la aKo est sensiblement plus élevée (5.3 ± 0.3 mM) que dans le reste du B.O. (Fig. 40.).

2- Animaux âgés de 21 jours et plus

Vers la fin de la troisième semaine de vie PN aKo se stabilise à une valeur moyenne de 3.3 ± 0.4 mM. Cependant, comme le montre la

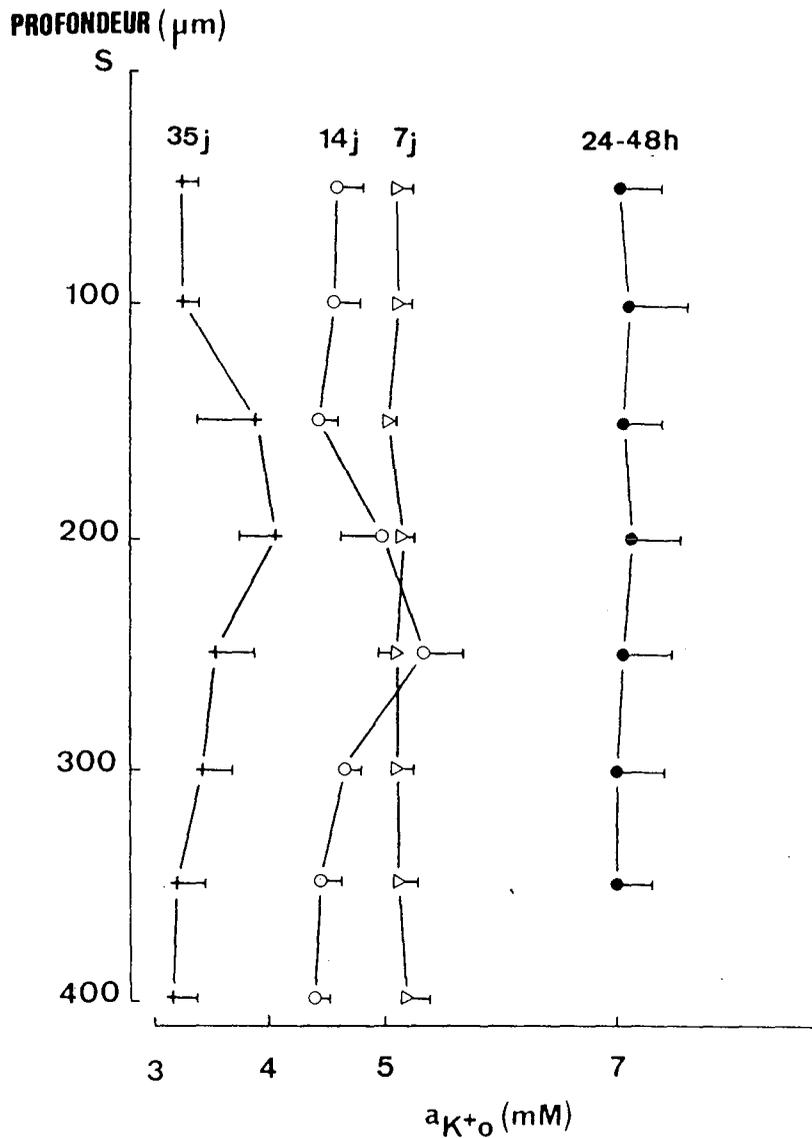


FIGURE 40:

Fluctuations de l'activité potassique de base (a_{K^+o} , mM) dans le bulbe olfactif de rats de différents âges.

● : 24-48 heures PN.

Δ : 7 jours PN.

o : 14 jours PN.

+ : 35 jours PN.

Chaque point représente la moyenne \pm E.S. de $n = 35$ évaluations à chaque âge.

Les profondeurs sont données en μm à partir de la surface (S) du bulbe.

figure 40, quand la K-MIS traverse une zone allant de -100 à -250 μm , elle détecte une activité potassique sensiblement plus élevée. Cette zone correspond, selon nos contrôles histologiques, à la couche glomérulaire où se terminent toutes les fibres afférentes du nerf olfactif (cf. Fig. 2.). La aKo est de 4.0 ± 0.3 mM au niveau de cette zone; la différence entre aKo glomérulaire et aKo moyenne au niveau des autres couches bulbaires étant significative à $p < 0.01$

B- DETERMINATION DES FREQUENCES DES POTENTIELS EXTRACELLULAIRES

Nous avons mesuré les fréquences des PA extracellulaires dans deux zones bulbaires; une zone superficielle correspondant à la couche glomérulaire et une zone profonde correspondant à la couche plexiforme. L'activité électrique enregistrée est amplifiée et analysée (cf. MATERIELS et METHODES) avant d'être recueillie sous forme d'activité intégrée.

Dans la mesure où nous avons travaillé sur des animaux anesthésiés, les fréquences d'activité électrique que nous avons déterminées n'ont qu'une validité relative car les anesthésiques dépriment l'activité nerveuse.

Malgré cela, la fréquence d'émission des neurones bulbaires nous donnera une indication sur l'activité bulbaire à l'instant où celle-ci est considérée.

1- Période périnatale

A la naissance et jusqu'à la fin de la première semaine de vie PN, l'activité électrique du bulbe olfactif est assez réduite. Au niveau glomérulaire, nous avons déterminé une fréquence d'émission spontanée de 4.0 ± 0.8 PA / sec. Au niveau plexiforme la fréquence est de 3.5 ± 0.4 PA / sec.

Les potentiels extracellulaires enregistrés chez le jeune animal ont une allure immature; en effet, ils sont assez lents et certains présentent une phase en plateau prolongeant la phase de dépolarisation (Fig. 41.)

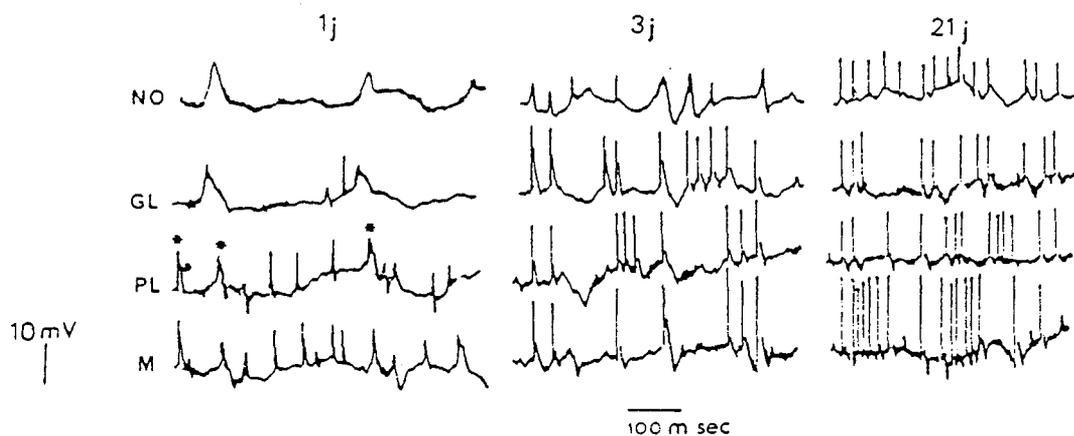


FIGURE 41 :

Exemples d'enregistrements d'activité électrique des neurones bulbares à 1 jour; 3 jours et 21 jours.

NO : nerf olfactif; GL : couche glomérulaire; PL : couche plexiforme externe; M : couche des cellules mitrales.

**: potentiels fragmentés*

(d'après MATH, avec autorisation)

2- Animaux âgés de 21 jours et plus

Chez les animaux âgés de trois semaines et plus, la fréquence d'émission spontanée est plus élevée et plus régulière que chez le jeune animal.

La fréquence moyenne chez un animal âgé de 35 jours par exemple, est de 16.5 ± 2.5 PA / sec. au niveau glomérulaire et plexiforme.

C- INHIBITION GABA-ERGIQUE

Nous nous proposons, dans ce chapitre, d'aborder quelques aspects de la mise en place des réponses GABA-ergiques inhibitrices au cours du développement postnatal du B.O. du rat. Dans ce but, nous avons procédé à l'application iontophorétique de GABA dans différentes zones bulbaires tout en enregistrant les variations de l'activité potassique extracellulaire et de la fréquence d'émission des neurones bulbaires. Ensuite, nous appliquons un antagoniste du GABA, la bicuculline et un agoniste du GABA, le baclofène.

De plus, nous procédons à l'enregistrement des potentiels extracellulaires dont la modification pendant l'application des différentes substances nous donnera une indication sur la nature des récepteurs GABA activés.

1- Période périnatale

a- couches superficielles

Nous avons implanté l'assemblage d'électrodes (K-MIS + référence + pipette d'iontophorèse) chez des animaux âgés de 0 à 48 heures PN à une profondeur comprise entre -50 et -100 μm en dessous de la surface du bulbe; cette zone correspond à la future couche glomérulaire en cours de formation (MATH, 1984.)

L'application de GABA (20 sec.) à partir de la source iontophorétique provoque une augmentation quasi-immédiate et dose-dépendante de aK. Ainsi, pour un courant de 100 nA (Fig. 42, A), la variation de aK est de 1.3 ± 0.2 mM (n = 25.). Cette élévation de aK

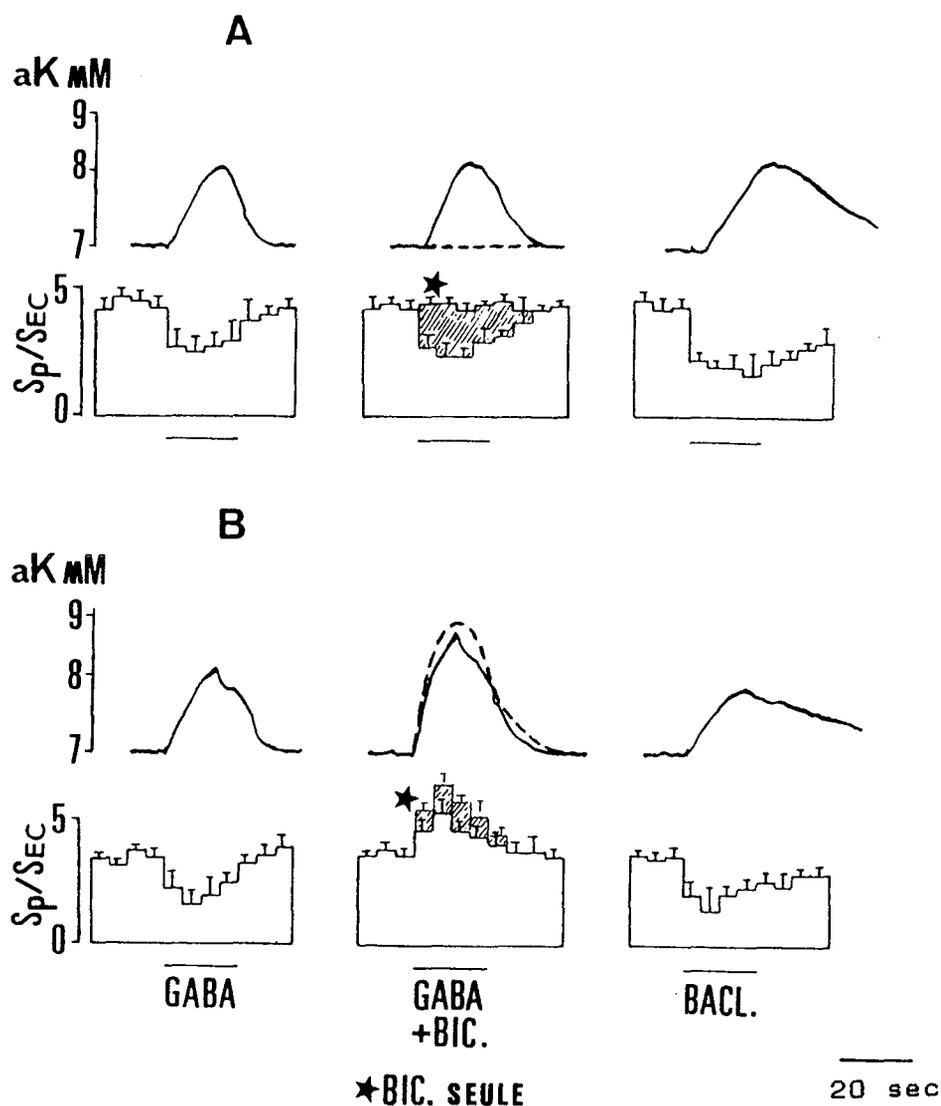


FIGURE 42 :

Tracés des variations de aK et histogrammes de distribution des fréquences des potentiels extracellulaires des cellules mitrales enregistrés en réponse à l'application iontophorétique de GABA (100 nA), de bicuculline (60 nA) et de baclofène (100 nA) chez des rats âgés de 24-48 heures ($n = 25$).

A- Réponses obtenues dans la couche glomérulaire.

B- Réponses obtenues dans la couche plexiforme externe.

Les colonnes hachurées et les lignes pointillées représentent la réponse à la bicuculline seule.

Les colonnes donnent la fréquence moyenne \pm E.S. (spike/sec) pendant des périodes de 5 sec.

Les tracés correspondant aux signaux potassiques sont des tracés originaux retouchés.

s'accompagne d'une chute concomitante de la fréquence des potentiels extracellulaires qui passe de 4.0 ± 0.8 à 2.8 ± 0.5 PA / sec.

Ces effets du GABA sont mimés par l'application de baclofène (100 nA) qui provoque une élévation de aK du même ordre que celle obtenue avec le GABA mais qui n'est maximale qu'après une latence de 3 à 4 sec. (Fig. 42, A.). De plus, le retour à aKo est plus lent que dans le cas de l'application de GABA. Par ailleurs, l'effet du baclofène sur la fréquence d'émission est immédiat (la fréquence passe de 4.0 ± 0.8 à 2.1 ± 0.3 PA / sec.) et se prolonge plusieurs secondes après la fin de l'application du baclofène.

En ce qui concerne le blocage des effets du GABA par la bicuculline, nous n'en avons observé aucune manifestation significative à ce niveau. Ainsi, l'application simultanée de GABA (100 nA) et de bicuculline (60 nA) n'affecte nullement la réponse au GABA seul (Fig. 42, A.).

Partant du fait que la bicuculline bloque les potentiels inhibiteurs (NOWYCKY *et al*, 1981) augmentant ainsi la fréquence de décharge des neurones (HAMON et HEINEMAN, 1985), nous avons testé l'application de bicuculline seule (Fig. 42, A, étoile.). La bicuculline n'affecte pas de manière significative la aK et la fréquence des PA extracellulaires au niveau glomérulaire.

Pour vérifier s'il existe à ce niveau une éventuelle désensibilisation des récepteurs GABA_A, nous avons allongé le temps d'application du GABA. Une application de GABA (100 nA) pendant 40 sec. se traduit par une élévation progressive de aK qui se maintient pendant toute la durée de l'application, donc sans désensibilisation des récepteurs GABA (Fig. 43.). L'élévation progressive de aK témoigne, quant à elle, d'une probable absence de mécanismes de prélèvement du GABA appliqué.

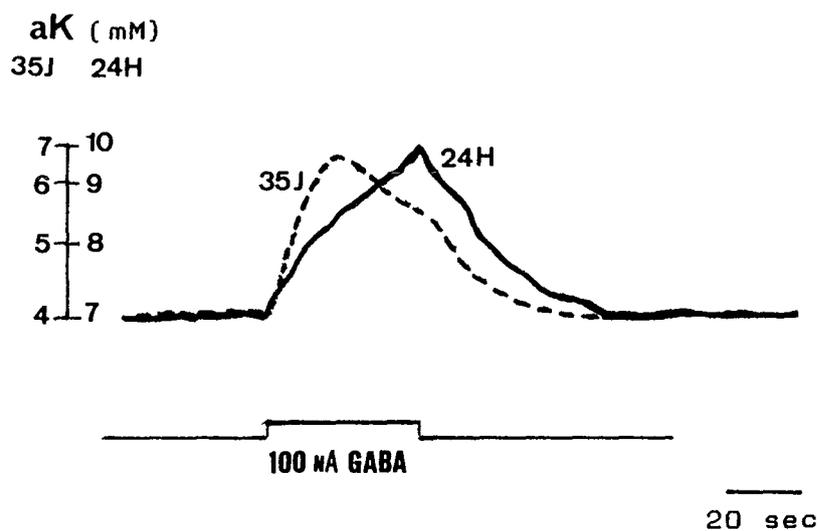


FIGURE 43 :

Comparaison des effets du GABA (100 nA) au niveau glomérulaire sur la variation de aK mesurée chez des rats âgés de 24 heures et 35 jours mettant en évidence l'absence de désensibilisation des récepteurs GABA chez le jeune animal.

Durée du pulse : 40 sec.

b- couches profondes

Dans le cas présent, l'assemblage d'électrodes est placé à une profondeur comprise entre -200 et -300 μm . A ce niveau, les réponses à l'application des différentes substances se distinguent par certains aspects des réponses obtenues en surface.

Les réponses au GABA (100 nA) et au baclofène (100 nA) sont pratiquement les mêmes, exception faite de l'action soutenue du baclofène dont l'effet sur aK et sur la fréquence d'émission se maintient, comme c'est le cas dans la couche glomérulaire, au-delà du temps d'application (Fig. 42, B.)

La différence essentielle entre les réponses profondes et superficielles réside dans l'apparition, au niveau profond, de l'antagonisme de la bicuculline vis-à-vis des réponses au GABA. Ainsi, l'application de GABA (100 nA) et de bicuculline (60 nA) se traduit par une abolition des effets du GABA et une activation des décharges (Fig. 42, B.). L'élévation de aK est sensiblement plus ample que dans le cas de l'application du GABA seul (2.0 ± 0.2 contre 1.2 ± 0.3 mM pour le GABA seul.). De plus, la fréquence d'émission est accrue et passe de 3.5 ± 0.4 à 5.0 ± 0.8 PA / sec. L'application de bicuculline seule (Fig. 42, B, étoile) se traduit par des effets identiques mais plus marqués sur aK et sur la fréquence d'émission.

2- Animaux âgés de 3 à 7 jours

Chez les animaux âgés de plus de 48 heures, les réponses aux trois substances appliquées sont les mêmes que celles observées au niveau des couches profondes des animaux âgés de 0 à 48 heures. En effet, à partir du 3ème jour PN la bicuculline antagonise les réponses au GABA au niveau superficiel faisant disparaître les différences entre réponses superficielles et réponses profondes à l'application du GABA, de la bicuculline et du baclofène.

3- Animaux âgés de 21 jours et plus

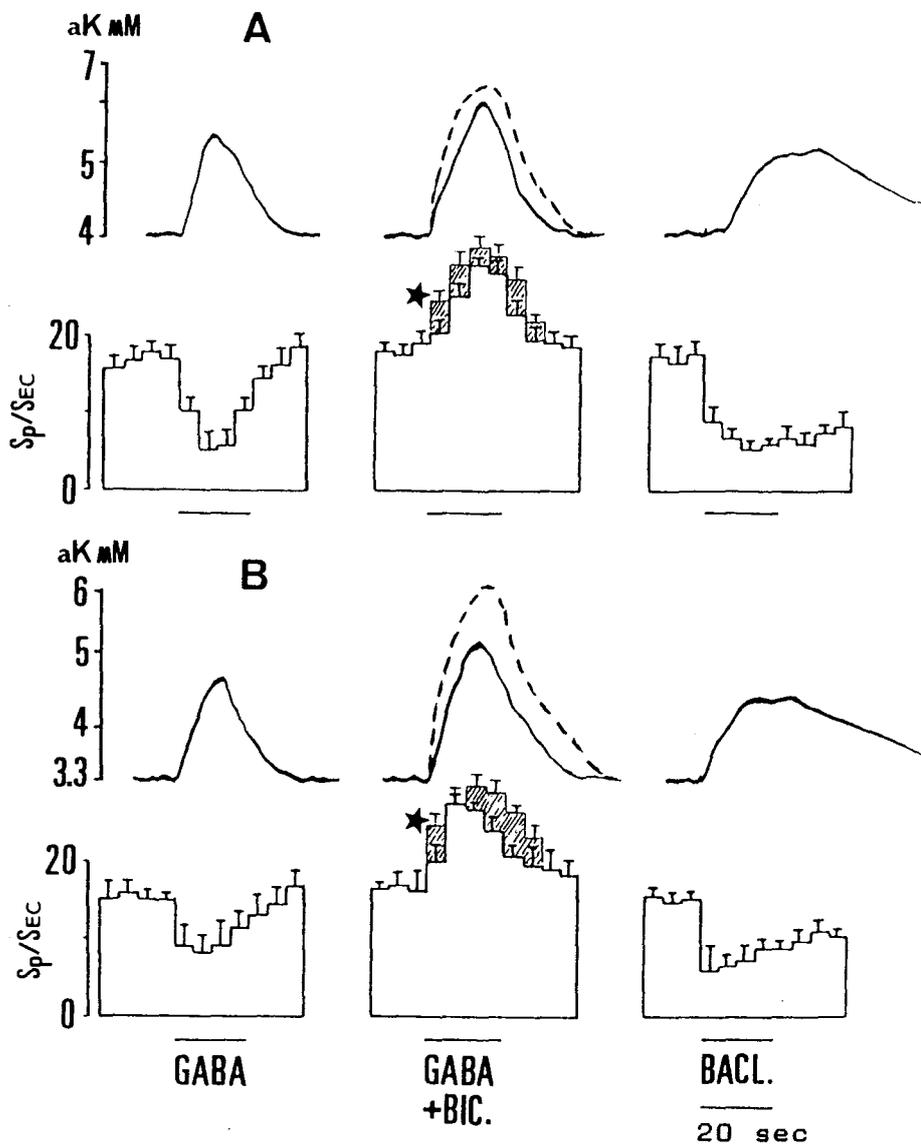
L'application iontophorétique de GABA chez les rats âgés de 3 semaines et plus se traduit par une élévation de aK de l'ordre de celle

observée chez le jeune animal. Ainsi, l'élévation de aK est de 1.3 ± 0.2 mM (n = 33) pour une application de 100 nA de GABA (Fig. 44.)

L'élévation de aK s'accompagne d'une chute concomittante de la fréquence des potentiels extracellulaires qui est plus importante au niveau glomérulaire. En effet, la fréquence passe de 18 à 5 PA / sec. en moyenne au niveau glomérulaire (Fig. 44, A) et de 16 à 8 PA / sec. au niveau plexiforme (Fig. 44, B.)

L'application de baclofène (100 nA) produit une élévation de aK voisine de celle provoquée par l'application de GABA (Fig. 44.). Comme chez le jeune animal, l'élévation de aK et la chute de la fréquence des PA qui l'accompagnent se prolongent au-delà du temps d'application. De plus, au niveau glomérulaire l'élévation de aK ne débute que 4 à 5 sec. après le début de l'application du baclofène.

En ce qui concerne la bicuculline, celle-ci bloque les effets du GABA en levant l'inhibition produite par ce dernier (Fig. 44). En présence de bicuculline, la fréquence d'émission est, de surcroît, augmentée et atteint une valeur de 25 PA / séc. L'augmentation de la fréquence des PA produit, en retour, un efflux potassique supérieur à celui observé pour le GABA seul. Ainsi, l'augmentation de aK est de 2.7 ± 0.5 mM, n = 33, pour l'application de GABA (100 nA) et de bicuculline (60 nA.). L'action de la bicuculline sur aK et sur la fréquence des PA est plus prononcée quand elle est appliquée seule (Fig. 44, étoiles.)



★ BIC. SEULE

FIGURE 44 :

Tracés des variations de aK et histogrammes de distribution des fréquences des potentiels extracellulaires des cellules mitrales enregistrés en réponse à l'application iontophorétique de GABA (100 nA), de bicuculline (60 nA) et de baclofène (100 nA) chez des rats âgés de 35 jours (n = 33).

A- Réponses obtenues dans la couche glomérulaire.

B- Réponses obtenues dans la couche plexiforme externe.

Les colonnes hachurées et les lignes pointillées représentent la réponse à la bicuculline seule.

Les colonnes donnent la fréquence moyenne \pm E.S. (spike/sec) pendant des périodes de 5 sec.

Les tracés correspondant aux signaux potassiques sont des tracés originaux retouchés.

III-DISCUSSION

A- METABOLISME MINERAL DANS LE BULBE OLFACTIF

Deux types d'inhibition modulent l'activité nerveuse du S.N.C., il s'agit de l'inhibition postsynaptique et de l'inhibition présynaptique.

La libération de neurotransmetteur(s) spécifique(s), par exemple le GABA, au niveau des synapses inhibitrices est à l'origine de l'inhibition postsynaptique (ECCLES, 1964). L'activation des synapses inhibitrices se traduit par une augmentation de perméabilité aux ions K^+ et Cl^- de la membrane postsynaptique, qui tend à œuvrer contre l'initiation de potentiels d'action.

L'inhibition présynaptique est moins bien définie; néanmoins, elle semble localisée dans des régions contenant un grand nombre de terminaisons d'afférences primaires. Ces dernières sont dépolarisées par un processus appelé dépolarisation des afférences primaires (P.A.D.) ce qui réduit l'amplitude des PA véhiculés par ces terminaisons. La P.A.D. et l'inhibition présynaptique présenteraient une relation de causalité (voir LEVY, 1977 et SYKOVA, 1983 pour revue). JAHR et NICOLL (1981) ont démontré l'existence de ces deux phénomènes au niveau des terminaisons du nerf olfactif que ces auteurs ont, par ailleurs, dépolarisées par le GABA.

Le baclofène a été proposé, au même titre que le GABA, comme une substance ayant une action présynaptique au niveau des afférences primaires se traduisant par la diminution de la libération de neurotransmetteur exciteur (CURTIS *et al*, 1981; DAVIES, 1981). Le baclofène, dont l'application provoque une hyperpolarisation des neurones centraux (NEWBERRY et NICOLL, 1984, hippocampe), produirait une augmentation de la conductance potassique au niveau de ces neurones (GAHWILER et BROWN, 1984). Au niveau de la moelle épinière, l'application iontophorétique de baclofène provoque une dépression de la transmission synaptique excitatrice (FOX *et al*, 1978) en réduisant l'amplitude des courants calciques entrants sans affecter, semble-t-il, les conductances potassiques (ROBERTSON et TAYLOR, 1986).

Enfin, le K^+ est désigné comme étant le principal responsable de la P.A.D., notamment au niveau des zones profondes de la moelle épinière, où les afférences primaires se terminent (SYKOVA, 1983). En effet, le K^+

libéré par les terminaisons des afférences primaires ou les fibres amyéliniques s'accumule dans les espaces extracellulaires provoquant une dépolarisation des fibres ou afférences adjacentes (JAHR et NICOLL, 1981, bulbe olfactif; SYKOVA, 1983). C'est cet aspect de l'inhibition présynaptique que nous allons discuter dans le prochain paragraphe.

1- Influence de la stimulation des afférences primaires sur l'activité potassique extracellulaire

La stimulation électrique des afférences primaires conduit à la libération de K^+ par les neurones et par les afférences primaires elles-mêmes; l'activité potassique extracellulaire pouvant, ainsi, augmenter de plusieurs millimoles selon l'intensité, la fréquence et la durée de la stimulation (SYKOVA, 1983).

L'étude comparative des amplitudes des variations de aK produites par la stimulation de différents types d'afférences (GALVAN *et al*, 1981) a montré que les fibres amyéliniques libéraient nettement plus de K^+ que les fibres myéliniques. De plus, cette étude a montré qu'au niveau des fibres amyéliniques, la valeur de la variation de aK était proportionnelle à la fréquence de stimulation atteignant 2.5 mM pour une stimulation d'une trentaine de Hz, pendant 30 sec.; cette relation est quasi linéaire pour les valeurs testées par les auteurs, et qui étaient comprises entre 1 et 128 Hz.

Dans ce contexte, il n'est pas surprenant de constater que des variations de aK de l'ordre de 6 à 7 mM aient été enregistrées en réponse à une stimulation (33 Hz pendant 3 sec) de fibres du N.O. de tortue (ENG et KOCSIS, 1987). Cependant, il faut noter que les études sus-citées ont été conduites *in vitro* sur des préparations dont l'intégrité structurale, notamment les lamelles gliales enveloppant les fibres, et qui constituent une barrière à la diffusion du K^+ , a été quelque peu altérée; ce qui augmente considérablement la valeur de la variation de aK (GALVAN *et al*, 1981).

Ainsi, JAHR et NICOLL (1981) ont-ils enregistré une variation de aK de 2 à 4 mM pour un choc unique du N.O. de grenouille *in vitro*. Une variation du même ordre a été enregistrée par ENG et KOCSIS (1987) au niveau d'une préparation de B.O. de tortue *in vitro*. Dans notre préparation *in vivo*, l'amplitude de la variation de aK au niveau de la couche du N.O. en

réponse à une stimulation de 10 à 50 Hz est nettement inférieure à celles observées *in vitro*; elle varie entre 0.2 et 0.4 mM.

En ce qui concerne les autres couches bulbaires, une comparaison entre les réponses enregistrées à différentes profondeurs pour la même stimulation nous a permis de confirmer un résultat déjà démontré *in vitro* (JAHR et NICOLL, 1981) et qui montre que la variation de aK est plus ample et plus rapide au niveau de la couche glomérulaire. Dans la moelle épinière, la plus importante élévation de aK, en réponse à la stimulation des nerfs périphériques, a été enregistrée au niveau des couches profondes de la corne dorsale qui contiennent une grande densité en neurones et surtout en terminaisons d'afférences primaires (SYKOVA, 1981). Ceci pourrait donc expliquer la production de flux potassiques très amples au niveau de la couche glomérulaire, au sein de laquelle se terminent tous les axones du N.O., et qui contient une importante agrégation d'éléments neuronaux (SHEPHERD, 1972).

2- Accumulation du K⁺ dans les glomérules olfactifs (KHAYARI, MATH et DAVRAINVILLE, 1988 a)

Nous avons enregistré au sein des glomérules olfactifs des variations de aK en deux temps en réponse à la stimulation du N.O.; ces variations commencent sous forme d'une élévation primaire de aK déjà décrite plus haut (0.8 à 1 mM) suivie dans certaines conditions de stimulation par une seconde variation (3 à 4 mM) que nous avons appelée "pic K⁺".

Dans toute la littérature que nous avons consultée, il n'est fait qu'une seule fois état d'une telle variation biphasique de aK, enregistrée par HEINEMANN et LUX (1977) dans le cortex cérébral du chat en réponse à la stimulation répétitive du noyau thalamique ventro-postéro-latéral. Les auteurs ne donnent, cependant, pas d'explication à l'apparition de ce phénomène; il est à noter que la stimulation des autres noyaux thalamiques ne produit pas de variation de aK d'aussi grande amplitude.

Ceci nous amène à évoquer la première condition que nous avons dû respecter pour pouvoir enregistrer un pic K⁺ et qui consistait à placer l'électrode de stimulation soigneusement dans le prolongement des fibres du N.O. Ceci se rapporte vraisemblablement à la topographie des bandelettes d'axones qui longeraient la surface bulbaire parallèlement les unes aux autres comme l'a suggéré FREEMAN (1974a) chez le chat.

Nous avons essayé de confirmer cette hypothèse par l'utilisation d'électrodes de stimulation multiples (ou de double K-MIS). Quand les électrodes de stimulation sont disposées de telle sorte que l'une soit dans le prolongement de la K-MIS et l'autre soit déportée latéralement de 300 à 500 μm , nous constatons que la stimulation du N.O. par l'électrode déportée ne produit pas de pic K^+ dans le glomérule où est logée la K-MIS. Ceci pourrait, donc, constituer un indice supplémentaire sur l'absence de recouvrement des bandelettes d'axones, du moins au niveau de la partie médiodorsale du bulbe olfactif.

Par ailleurs, la localisation de la zone où se produit le pic K^+ par la détermination de la profondeur de la K-MIS, quand celle-ci enregistre le pic K^+ ou par la vérification histologique, nous a permis de conclure que le pic K^+ ne se produit que dans le glomérule et plus précisément à la base de celui-ci, c'est-à-dire à une profondeur de $200 \pm 30 \mu\text{m}$ en partant de la surface. Anatomiquement, cette profondeur correspond à la zone d'émergence des troncs dendritiques des deutoneurones bulbaires. Ces troncs ne présentent pas de synapses et sont enveloppés dans des lamelles gliales constituant une extension de la capsule gliale entourant partiellement le glomérule (PINCHING et POWELL, 1971b).

A l'extérieur du glomérule (dans la couche plexiforme externe), des axones de cellules périglomérulaires établissent des synapses axo-dendritiques avec le tronc de la dendrite primaire des deutoneurones; ces synapses peuvent produire des potentiels dendritiques se propageant électrotoniquement le long du tronc dendritique aussi bien ortho- qu'antidromiquement (FREEMAN, 1974b). Ces potentiels représentent le résultat de l'intégration de multiples interactions synaptiques complexes et d'effets liés à la transmission synaptique se produisant par accumulation d'ions K^+ (MORI *et al*, 1984).

3- Accumulation de K^+ et dépolarisation des afférences primaires (P.A.D.)

Comme nous l'avons évoqué pour l'inhibition GABAergique, la dépolarisation des afférences primaires (P.A.D.) pourrait jouer un rôle capital dans le mécanisme d'inhibition présynaptique. En l'absence, au niveau des glomérules, de synapses axo-axoniques auxquelles la P.A.D. a d'abord été associée (ECCLES, 1964), le phénomène de P.A.D. semble se produire par

la libération de substances non-spécifiques telles que le K^+ ou certains neurotransmetteurs (Gluamate, GABA, etc ..., FREEMAN, 1974b). En effet, il a été observé que la transmission d'influx le long de fibres du N.O. de grenouille stimulées naturellement avait une action inhibitrice sur les fibres non stimulées; cette action s'opère par inhibition présynaptique (VORONKOV et GUSEL'NIKOVA, 1967) en relation avec la dépolarisation des fibres du N.O. (JAHR et NICOLL, 1981). Ce processus de dépression de l'excitabilité des fibres nerveuses prend place au sein du glomérule où se terminent les afférences primaires; il serait indépendant de l'inhibition récurrente (VORONKOV et GUSEL'NIKOVA, 1967; FREEMAN, 1974b). C'est sur cette base que fut suggérée *l'atténuation de la transmission glomérulaire* (FREEMAN, 1974b) qui résulterait de la libération de substances non-spécifiques (FREEMAN, 1974b; JAHR et NICOLL, 1981; MORI *et al*, 1984).

La concomitance des phénomènes de dépolarisation des afférences primaires et d'accumulation de K^+ dans l'espace extracellulaire (JAHR et NICOLL, 1981) milite en faveur d'une action du K^+ lui-même sur les afférences dépolarisées sans activation préalable. Cependant, la dépolarisation des fibres du N.O. et l'augmentation de aK dépendent étroitement de la transmission synaptique car quand celle-ci est bloquée (par le cobalt, par exemple) ces phénomènes sont atténués, voire même abolis (JAHR et NICOLL, 1981).

Une démonstration probante de l'implication des ions K^+ dans la dépolarisation des afférences primaires du N.O. nous est fournie dans une étude récente (ENG et KOCSIS, 1987) dans laquelle le drainage des B.O. par des solutions contenant des concentrations croissantes en K^+ , produit une augmentation d'excitabilité des fibres nerveuses pour les faibles concentrations (3 à 7 mM K) et une réduction d'excitabilité voire un blocage de la conduction pour des concentrations plus élevées (12 à 17 mM K^+). Par ailleurs, il est montré, dans cette même étude de ENG et KOCSIS, que la stimulation inframaximale des fibres du N.O. provoque une augmentation progressive de aK et l'apparition d'une période supranormale (S.N.P.) pendant laquelle la vitesse de conduction est accrue. Cette S.N.P. disparaît quand la concentration en K^+ dans la solution de drainage du N.O. est supérieure d'environ 5 mM à la aK de base. Les stimuli inframaximaux activent un certain nombre de fibres, le K^+ produit par ces fibres dépolarise

les fibres adjacentes qui sont activées ou recrutées à leur tour par le stimulus suivant.

A l'inverse, l'application de stimuli supramaximaux provoque, d'emblée, l'activation de toutes les fibres de telle sorte que le stimulus suivant provoque l'apparition de PA dans ces fibres. Dans ce cas, le K^+ produit par les fibres va dépolariser celles-ci, ce qui aboutit à une réduction de l'amplitude des PA et par conséquent à une réduction de l'amplitude de la réponse du N.O.. ENG et KOCSIS concluent à la contribution de la dépolarisation des fibres et de l'accumulation de K^+ aux changements d'excitabilité observés pendant la S.N.P. des fibres amyéliniques du N.O..

Le K^+ semble, donc, jouer un double rôle selon le degré de son accumulation dans l'espace extracellulaire. Il contribue, d'abord, à l'installation de la période de supranormalité pendant laquelle l'excitabilité est accrue. Ensuite, quand l'accumulation du K^+ prend de l'ampleur, elle débouche sur une disparition de la S.N.P. et une diminution de l'excitabilité, voire un blocage de la conduction des fibres du N.O.

Ce dernier aspect revêt une importance particulière dans le cadre de notre étude car il apporte un élément d'information supplémentaire pour l'explication de la dépression de la fréquence des potentiels extracellulaires observée pendant la formation du pic K^+ . Cependant, la suppression de la S.N.P. dans l'étude de ENG et KOCSIS (1987) nécessite une variation de aK de l'ordre de 3 à 4 mM au dessus de la valeur de repos; nous n'avons, pour notre part, jamais enregistré de variation de cette amplitude dans la couche du nerf olfactif.

Ceci nous amène à penser, en toute rigueur, que l'accumulation de K^+ , qui se produit dans le N.O. en réponse à une stimulation supramaximale, ne peut refléter l'ampleur du processus de compression dynamique prenant place au sein des glomérules. C'est donc dans le glomérule lui-même qu'il faut rechercher la base anatomo-fonctionnelle du mécanisme inhibiteur qui se manifeste par une accumulation de K^+ en deux temps. A cet égard, il faut rappeler que la géométrie du glomérule, défini comme étant une sphérule du neuropile bulbaire partiellement enveloppé de lamelles gliales (PINCHING et POWELL, 1971b), est, vraisemblablement, responsable de l'amplification des fluctuations du métabolisme électrolytique et de la quasi-absence de diffusion d'ions ou d'autres substances vers les zones voisines (FREEMAN, 1974b; KHAYARI *et al*, 1988a, 1988c).

Si la géométrie du glomérule peut être responsable de la convergence d'innombrables flux ioniques issus de milliers de fibres - raison pour laquelle les flux ioniques sont les plus importants dans la couche glomérulaire - elle ne peut expliquer à elle seule l'allure biphasique de l'accumulation de K^+ dans le glomérule.

4- Origine du pic K^+

Dans l'ensemble, nos tentatives de détermination de l'origine probable du pic K^+ sont restées vaines; par conséquent nous ne pouvons qu'émettre des hypothèses sur la base de certains éléments fournis par l'expérimentation, ou trouvés dans la littérature. L'application de K^+ exogène dans les glomérules n'a pas abouti à la production de pic K^+ sans stimulation préalable du N.O., mais elle nous a permis de constater que le K^+ produisait bien une chute de la fréquence de décharge des neurones bulbaires (KHAYARI, 1985).

La stimulation du N.O. représente la condition *sine qua non* pour la production d'un pic K^+ . Il apparaît donc, que les phénomènes liés à la dépolarisation des afférences primaires par le K^+ ne sont pas responsables à eux seuls de l'apparition du pic K^+ .

Par ailleurs, la continuation de la stimulation n'est pas absolument nécessaire à l'apparition du pic K^+ une fois que celui-ci a été initié, car le pic K^+ peut apparaître à la fin d'une stimulation de 20 sec de durée. Etant donné que la cessation de la stimulation ne s'accompagne pas, dans ce cas, d'un retour progressif à aK_0 mais, au contraire, d'une élévation rapide de aK formant ainsi le pic K^+ , ceci voudrait dire qu'il pourrait se produire un phénomène de généralisation des conséquences de la stimulation supramaximale à l'ensemble du neuropile glomérulaire. En d'autres termes, tout porte à croire qu'il y'a occlusion totale du glomérule où se produit un pic K^+ .

Deux éléments sont en faveur de cette hypothèse; il s'agit, en premier lieu, de la localisation du pic K^+ au niveau de la zone d'émergence du tronc dendritique des cellules mitrales (voir plus haut), et, en deuxième lieu, nous pensons que les variations du métabolisme oxydatif sont en rapport avec ce phénomène.

En effet, il a été démontré qu'il existait une corrélation étroite entre l'accroissement du métabolisme glucidique et l'élévation de aK_0 dans

plusieurs régions du S.N. (SYKOVA, 1983); l'activité métabolique étant associée au rétablissement actif des gradients ioniques (LEWIS et SCHUETTE, 1975; LOTHMAN *et al*, 1975). De plus le marquage individuel d'unités glomérulaires par le 2-désoxyglucose, induit par la stimulation odorante de l'épithélium olfactif chez le rat (JOURDAN *et al*, 1980; JOURDAN, 1984) plaide en faveur de l'hypothèse métabolique que nous avons essayé, par ailleurs, d'étayer en altérant le métabolisme glucidique par injection d'insuline.

La réponse que nous avons enregistrée après l'injection d'insuline fut une disparition de l'allure biphasique de la variation de aK en réponse à la stimulation du N.O.; l'augmentation de aK étant par ailleurs très rapide et d'amplitude supérieure à celle de la réponse témoin. Par conséquent, nous pouvons dire que l'altération du métabolisme glucidique provoque, probablement, une déficience de la recapture du K^+ par la mise en jeu des pompes membranaires comme les Na, K-ATPases et que l'augmentation de aK peut provoquer ou traduire une augmentation de la perméabilité membranaire (VYSKOCIL *et al*, 1972).

Ceci nous amène à évoquer certains phénomènes liés au dérèglement du métabolisme électrolytique comme la dépolarisation anoxique ou la dépression envahissante. Nous avons provoqué ces deux phénomènes pathologiques et avons noté que les variations de aK qu'elles induisaient dépassaient très largement, en amplitude, celle du pic K^+ (15 à 20 mM et plus contre 3 à 4 mM pour le pic K^+). Il est, donc, peu probable que de tels phénomènes pathologiques prennent part à la formation du pic K^+ .

5- Influence des ions sur le pic K^+

En continuant nos recherches sur l'origine du pic K^+ , nous avons procédé à l'application intraglomérulaire d'ions exogènes pour modifier l'apparition de ce phénomène. L'influence d'un certain nombre d'ions sur les caractéristiques du pic (latence, amplitude et durée) est résumée dans le tableau qui suit:

	Latence	Amplitude	Durée	Bilan
K 100 nA	↓	↑	↑	+
Ca 100 nA	↑	↓	→	-
Co 60 nA	↑	↓	↓	-

(+ : *Effet facilitateur*, -- : *Effet dépresseur*)

Comme le montre ce tableau, les ions Ca^{++} et Co^{++} ont un effet dépresseur sur le pic K^+ alors que le K^+ le renforce et facilite sa formation. Ceci démontre la dépendance du phénomène vis-à-vis du K^+ et plus précisément de la valeur de $a\text{K}_0$, et la nécessité d'une transmission synaptique optimale; les résultats de JAHR et NICOLL (1981) à propos du blocage de la transmission par le cobalt, confirment cette idée.

L'action du Ca^{++} sur le pic K^+ étant moins évidente à caractériser, nous avons eu recours à l'utilisation de microélectrodes calcium-sensitives pour l'enregistrement des flux calciques se déroulant pendant la formation du pic K^+ .

6- Pic K^+ / pic Ca^{++}

L'utilisation simultanée d'une K-MIS et d'une Ca-MIS, nous a permis d'enregistrer, en réponse à la stimulation efficace du N.O., une variation de $a\text{Ca}$ en deux temps à l'image de la variation de $a\text{K}$. Mais la variation de $a\text{Ca}$ était de sens opposé, c'est-à-dire qu'elle traduisait une baisse de $a\text{Ca}_0$. En effet, nous avons enregistré un pic Ca^{++} qui était, en quelque sorte, le négatif du pic K^+ mais qui présentait un certain retard par rapport à celui-ci suggérant, ainsi, que la formation du pic Ca^{++} est probablement une conséquence de l'apparition du pic K^+ . Le blocage du pic Ca^{++} n'affecte pas totalement le pic K^+ ; cependant, nous nous devons d'émettre quelques réserves à propos de ce résultat car nous savons, à la lumière de ce qui précède, que le cobalt affecte la transmission synaptique, donc le pic K^+ .

Quoi qu'il en soit le pic Ca^{++} semble participer au processus d'occlusion glomérulaire, mais tout le calcium qui quitte le milieu extracellulaire n'est pas nécessaire à la production du pic K^+ . Néanmoins, la participation du Ca^{++} à la formation ou à l'initiation du pic K^+ peut se situer

à différents niveaux . Ainsi, peut-elle être liée aux conductances potassiques calcium-dépendantes responsables de l'inhibition GABAergique dans les dendrites des cellules pyramidales (BLAXTER *et al*, 1986) ou encore prendre part à la libération de plus grosses quantités de neurotransmetteurs. C'est ce que nous allons examiner dans le paragraphe suivant.

7- Influence des neurotransmetteurs sur le pic K⁺

Certains agents, comme des acides aminés (GABA, Glutamate, ...), des amines biogènes (sérotonine, ...) ou des changements locaux de pH peuvent contribuer à l'élévation de aK dans les tissus nerveux (SYKOVA et ORKAND, 1981). Nous avons, pour notre part, testé différentes substances dont l'influence sur les caractéristiques du pic K⁺ est résumée dans le tableau suivant :

Substance appliquée	Latence	Amplitude	Durée	Bilan
GABA (60-80 nA)	↓	↓	↑	+
GABA (100-200 nA)	↑	↓	↑	-
BACLOFENE	↓	↑	↑	+
GABA (100 nA) + BIC. (80 nA)	↓	→	↑	+
DOPAMINE (80 nA)	↑	↓	→	-
DOPAMINE (200 nA)	↓	↓	↑	+
HALOPERIDOL	↓	↑	↑	+
SEROTONINE (80 nA)	→	↓	→	-
SEROTONINE (200 nA)	↓	↑	↑	+

(+ : Effet facilitateur, - : Effet dépresseur)

Le bilan des effets des différentes substances testées montre que, *grosso modo*, seuls le GABA à forte dose et la dopamine à faible dose sont franchement dépresseurs vis-à-vis du pic K⁺. Ces effets sont, d'ailleurs,

levés en présence d'antagonistes de ces substances, à savoir la bicuculline pour le GABA et l'halopéridol pour la dopamine.

Les écarts observés entre les effets de différentes doses de GABA et de dopamine pourraient résulter d'une action des drogues au niveau de récepteurs situés sur différents types cellulaires. Ainsi, l'application de fortes doses d'une substance activerait-elle des interneurons mais également des cellules modulant l'activité de ces neurones via les synapses réciproques.

A la lumière de nos résultats concernant l'inhibition GABAergique (voir plus loin), nous pouvons penser que le GABA appliqué dans le glomérule activerait, à fortes doses (≥ 100 nA), aussi bien des récepteurs présynaptiques situés sur les terminaisons des axones du nerf olfactif que des récepteurs portés par les cellules périglomérulaires dont l'activité est modulée par les cellules à axone court superficielles qui sont, tout au moins pour certaines d'entre elles, GABAergiques (HALASZ et SHEPHERD, 1983).

Selon ce schéma, les cellules périglomérulaires inhiberaient les cellules mitrales mais seraient elles-mêmes inhibées par les cellules à axone court superficielles. Le résultat en serait une complication supplémentaire des interactions excitatrices et/ou inhibitrices dont la partie apicale de la dendrite primaire de la cellule mitrale est le siège (MORI, 1987).

Ainsi pouvons-nous penser, au risque de tirer une conclusion quelque peu prématurée, que la dépression du pic K^+ par les fortes doses de GABA témoigne de la persistance, pendant toute la durée de la stimulation, du fonctionnement optimal du glomérule, par le jeu des interactions synaptiques, sans qu'il n'y ait occlusion du glomérule par l'accumulation de K^+ , dont le pic K^+ témoigne. La fourniture de quantités suffisantes de GABA pendant toute la durée de stimulation du N.O., pour permettre la diffusion de GABA vers les synapses GABAergiques et pour atténuer les phénomènes de recapture du GABA endo- et exo-gène, favorise vraisemblablement la continuation des interactions synaptiques.

L'action du GABA sur le pic K^+ peut être extrapolée à celle observée dans les cellules pyramidales du cervelet (MALENKA *et al*, 1981; MALENKA et KOCSIS, 1982) au niveau desquelles le GABA provoque une réduction des flux potassiques produits par la stimulation des fibres parallèles. Dans cette structure, le GABA réduit l'activité dendritique des cellules pyramidales, ce qui se traduit par une diminution de la libération de K^+ et par une augmentation de l'excitabilité des fibres parallèles. Il est probable qu'un tel phénomène est susceptible de se produire au niveau de la

dendrite principale de la cellule mitrale, mais il faut tenir compte de la complexité synaptique de la région glomérulaire où le GABA pourrait réduire l'activité des cellules périglomérulaires qui sont elles-mêmes sous influence GABAergique (HALASZ et SHEPHERD, 1983).

En résumé, le K^+ libéré proviendrait non seulement de l'activité des dendrites mitrales mais également de celle des interneurons que le GABA déprime; ceci se traduit par une réduction de la libération de K^+ , donc de l'amplitude du pic K^+ .

Par ailleurs, l'existence de récepteurs GABA_B sur les terminaisons des axones du nerf olfactif (POTAPOV, 1985) explique parfaitement l'action facilitatrice du baclofène vis-à-vis du pic K^+ . En effet, il a été démontré que le baclofène avait une puissante action dépressive sur les terminaisons des afférences primaires qui s'opère par une diminution de la libération de neurotransmetteur excitateur par ces terminaisons (FOX *et al*, 1978).

Ces éléments sont confirmés par les essais de libération de neurotransmetteurs à partir de coupes tissulaires par le K^+ (PUMAIN et HEINEMANN, 1985). Dans ces essais, le baclofène, en agissant sur les récepteurs présynaptiques, produisait une réduction de la libération de divers neurotransmetteurs tels que les catécholamines, la sérotonine ou certains acides aminés excitateurs (COLLINS *et al*, 1985; MAJEWSKA et CHUANG, 1984).

D'autres expériences ont démontré que la libération de [³H]-NA, par le K^+ , dans le bulbe olfactif, est activée par le GABA, et bloquée par le baclofène (GERVAIS, 1987). Ainsi, l'activation durable des deutoneurons bulbaires provoquerait une augmentation de la libération de NA par une action des interneurons GABAergiques (GERVAIS, 1987) dont l'effet inhibiteur vis-à-vis des neurones de relais serait atténuée, en retour, par la NA (JAHR et NICOLL, 1982). Cependant, la NA à fortes doses peut provoquer des effets inverses allant dans le sens d'une dépression de la transmission, en augmentant la concentration extracellulaire en neurotransmetteurs excitateurs, ce qui provoque, en retour, une libération accrue de GABA endogène déprimant, donc, l'activité neuronale (COLLINS *et al*, 1985, cortex olfactif).

L'exemple de l'action mitigée de la NA, que nous venons de relater, rend compte de la difficulté d'interprétation de certains de nos résultats.

En ce qui concerne les autres substances testées, le problème est certainement encore plus complexe pour la DA car les cellules

dopaminergiques de la région périglomérulaire sont les cellules périglomérulaires mais aussi certaines cellules à panache et certaines terminaisons d'origine centrale (HALASZ et SHEPHERD, 1983). De plus, une étude récente (KOSAKA *et al*, 1987b) a démontré que les cellules dopaminergiques de la région juxtaglomérulaire sont également GABAergiques. Dans le bulbe olfactif, l'amplitude des potentiels évoqués par stimulation ortho- ou anti-dromique est réduite par la DA et augmentée par un antagoniste, la fluphénazine (HALASZ et SHEPHERD, 1983). Il est probable que la DA à fortes doses se lie à différentes catégories de récepteurs localisées sur différents types cellulaires, le tout se traduisant par un effet facilitateur vis-à-vis du pic K^+ .

Nous avons vu que l'application simultanée de GABA et DA avait une action dépressive sur le pic K qui était plus nette que lorsque ces deux composés sont appliqués séparément. Ce résultat est certainement lié à l'existence de cellules périglomérulaires à la fois catécholaminergiques et GABAergiques (KOSAKA *et al*, 1987b) dont la réponse varie en fonction de la ou des substance(s) appliquée(s). Ainsi, ces cellules pourront produire sur les deutoneurones, un effet dépresseur à trois variantes possibles: GABAergique, dopaminergique et GABAergique-dopaminergique.

La 5-HT provoque, quant à elle, une élévation de aK quand elle est appliquée au niveau des coupes d'hippocampe (SEGAL et GUTNICK, 1980); cette élévation est accompagnée d'une hyperpolarisation des cellules hippocampiques et d'une activation de conductance K^+ (GUTNICK et SEGAL, 1981).

Les effets de la 5-HT ont été comparés à ceux du GABA (GUTNICK et SEGAL, 1981); il devient donc aisé de comprendre la raison pour laquelle la 5-HT a un effet dépresseur sur le pic K^+ .

Pour conclure, nous pouvons dire que, dans l'état actuel des choses, et tant que le(s) neurotransmetteur(s) excitateur(s) libéré(s) par les terminaisons axoniques du nerf olfactif n'est (ne sont) pas connu(s) avec précision, il est extrêmement difficile d'expliquer clairement l'influence des neurotransmetteurs sur l'occlusion glomérulaire.

8- Diffusion du K dans le bulbe olfactif (KHAYARI, MATH et DAVRAINVILLE, 1988c)

Nous avons essayé d'étayer notre hypothèse de la localisation intraglomérulaire des phénomènes d'occlusion glomérulaire par l'examen de la diffusion de K^+ exogène appliqué au niveau de la couche glomérulaire.

Notre étude a montré la quasi-absence de diffusion du K^+ dans la couche glomérulaire; elle a également montré que cette diffusion pouvait être favorisée par l'application d'ouabaïne. Ce résultat nous a amené à entreprendre une étude dans laquelle nous avons comparé les activités Na,K-ATPasiques au niveau plexiforme et glomérulaire (voir plus loin).

L'activité potassique mesurée dans le B.O. par l'électrode MIS représente la résultante de différents mouvements de libération, de distribution dans l'espace intercellulaire, et de prélèvement du K^+ par les différents mécanismes de transport (SYKOVA, 1983). La diffusion du K^+ dans les tissus nerveux a été définie par CURTIS *et al* (1960) sous forme d'une équation modifiée par NICHOLSON *et al* (1979) qui y ont introduit deux facteurs tenant compte de la tortuosité et de la fraction volumétrique de l'espace extracellulaire (voir INTRODUCTION).

Dans la couche plexiforme externe, nos valeurs expérimentales, c'est-à-dire les variations de aK en réponse à l'application iontophorétique de K^+ exogène à 100 μm de distance de la K-MIS, sont en accord avec les valeurs théoriques calculées à partir de l'équation de diffusion sus-citée. A l'inverse aucune concordance entre les valeurs expérimentales et théoriques n'a été trouvée au niveau de la couche glomérulaire.

Une première explication à l'absence de diffusion du K^+ dans la couche glomérulaire nous a été fournie par l'examen, déjà évoqué plus haut, de la géométrie du glomérule. En effet, les lamelles gliales enveloppant le glomérule pourraient empêcher la diffusion du K^+ libéré, provoquer une amplification des flux potassiques et surtout empêcher le K^+ d'atteindre les glomérules ou les zones voisines (FREEMAN, 1974b).

La deuxième explication se base sur la redistribution du K^+ accumulé soit par diffusion dans le milieu extracellulaire ou à travers la barrière hémencéphalique, soit par recapture active et/ou passive par les cellules gliales (ORKAND *et al*, 1966; SYKOVA, 1981; TRACHTENBERG et POLLEN, 1969). Le mécanisme par lequel les cellules gliales prélèvent le K^+ a été appelé "*glial buffering system*" par ORKAND *et al* (1966), mais il n'est pas le seul en cause; en effet, les mécanismes actifs de transport transmembranaire du K^+ semblent prendre part à la recapture du K^+ (SYKOVA, 1983). Ces mécanismes, qui intéressent aussi bien les cellules

gliales que les éléments neuronaux se réalisent grâce à l'activation des pompes Na,K-ATPasiques.

Dans le cas qui nous intéresse, il semble, compte tenu de l'agrégation de terminaisons axoniques dans le glomérule, que les éléments neuronaux soient responsables de la recapture active du K^+ . Il apparaît, donc, que l'activation des pompes Na,K-ATPasiques représente le principal mécanisme par lequel le K^+ est prélevé, car l'ouabaine, qui bloque sélectivement les Na,K-ATPases, provoque la libre diffusion du K^+ dans la couche glomérulaire. Il est également intéressant de noter que le mécanisme de recapture du K^+ demeure opérationnel pour des valeurs de aK aussi grandes que 15 mM environ. Ainsi, seule une application de 800 nA de K^+ , qui porte aK à plus de 15mM, peut provoquer la surcharge du processus de recapture et permettre la diffusion du K^+ aux régions voisines.

Enfin, la baisse de aK observée dans certains tests (application de 800 nA de K^+ distal) pourrait résulter d'une manifestation locale de l'activation distale des Na,K-ATPases provoquée par le chargement du glomérule distal en K^+ exogène. Ceci peut constituer un mécanisme par lequel l'activation des pompes Na,K-ATPasiques peut gagner des régions voisines par la voie des connections interglomérulaires. C'est, donc, en toute logique que nous avons procédé au dosage de l'activité Na,K-ATPasiqne dans les zones glomérulaire et plexiforme pour tenter d'appuyer les deux explications données, plus haut, à l'absence de diffusion du K^+ dans la

9- Répartition régionale des Na,K-ATPases

(KHAYARI, MESFIOUI, MATH et DAVRAINVILLE, 1990)

Le dosage des activités enzymatiques (Na,K- et Mg-ATPases) dans les tissus prélevés à partir des couches glomérulaire et plexiforme a révélé une grande disparité dans la distribution régionale des concentrations d'activité tissulaire exprimées en $\mu\text{mole/g}$ tissu. En revanche, ces différences sont atténuées en importance pour les activités enzymatiques spécifiques, c'est-à-dire celles rapportées au taux de protéines. Celui-ci est supérieur de plus de 120 % dans la couche glomérulaire par rapport aux couches profondes indiquant que le contenu en membranes dans l'échantillon est très élevé et que la différence des concentrations d'activité tissulaire des enzymes est due à l'abondance de ces membranes plutôt qu'à une densité des enzymes au niveau de sites membranaires spécifiques.

De plus, l'activité Mg-ATPasique élevée mesurée dans les couches superficielles indique une abondance de membranes intracellulaires. Ainsi, LEWIN et HESS (1964) ont montré que la distribution de la Mg-ATPase dans le cortex, suivait celle des mitochondries alors que l'activité Na, K-ATPasique maximale se trouvait au niveau de plexus dendritiques et axonaux où les membranes plasmiques et le réticulum endoplasmique étaient abondants.

Etant donné que la vitesse de la synthèse protéique est nettement plus élevée dans les cellules nerveuses que dans les cellules gliales (BLOOMSTRAND et HAMBERGER, 1970), il est probable que les réseaux neuronaux glomérulaires soient responsables de la réabsorption active du K. Il n'en demeure pas moins vrai que les lamelles gliales enveloppant les bandelettes d'axones du N.O. et les glomérules participent certainement à la recapture du K.

Même si elle n'a pas apporté de précisions sur la localisation cellulaire des sites contenant les enzymes, notre étude a démontré une distribution spatiale de l'activité Na,K-ATPasique au niveau des couches bulbaires. Cette distribution coïncide avec les données anatomiques (HALASZ et SHEPHERD, 1983; PINCHING et POWELL, 1971a,b; SHEPHERD, 1972) qui ont démontré l'existence d'une importante densité en éléments neuronaux dans les couches qui présentent ici l'activité Na,K-ATPasique la plus élevée, à savoir les couches du nerf olfactif et la couche glomérulaire. Une relation directe entre la chute de l'activité Na, K-ATPasique et la réduction du développement des membranes et des synapses suite à la désafférentation du bulbe olfactif a été décrite par MEISAMI et MANOOCHEHRI (1977).

Une distribution semblable à la nôtre a été rapportée dans le cortex somatosensoriel (STAHL et BRODERSON, 1976) au niveau de régions contenant une grande densité synaptique et présentant une activité Na,K-ATPasique élevée qui semblait être localisée au niveau d'éléments neuronaux (BRODERSON *et al*, 1978) et plus précisément au niveau des synaptosomes (STAHL et BRODERSON, 1976).

A travers l'étude du métabolisme minéral dans le bulbe olfactif, nous avons abordé un des deux types d'inhibition modulant l'activité neuronale: l'inhibition présynaptique.

La libération de neurotransmetteur(s) inhibiteur(s) comme le GABA est à l'origine du second type d'inhibition: l'inhibition postsynaptique.

Ces deux types d'inhibition coexistent dans la mesure où l'inhibition présynaptique peut moduler le fonctionnement neuronal donc la transmission synaptique.

Nous allons nous intéresser dans le chapitre suivant à l'inhibition GABAergique à travers laquelle, les deux types d'inhibition vont être évoqués.

B- INHIBITION GABA-ERGIQUE DANS LE BULBE OLFACTIF

(MATH, KHAYARI et DAVRAINVILLE, 1988 b)

L'existence d'importantes quantités de GABA dans le bulbe olfactif (AUSTIN *et al*, 1979; HALASZ *et al*, 1979; HALASZ et SHEPHERD, 1983) et la participation de ce neurotransmetteur essentiellement au niveau de la synapse dendrodendritique entre les cellules mitrales et granulaires (FELIX et McLENNAN, 1971; MATH, 1984; McLENNAN, 1971) sont, maintenant, largement démontrées. Cependant, la majorité des études ayant traité des mécanismes d'action du GABA au niveau des synapses réciproques bulbaires a privilégié la cellule granulaire et la synapse qu'elle établit avec la cellule mitrale, et ce au détriment de la synapse réciproque entre les cellules périglomérulaire et mitrale.

Les expériences de TONOSAKI et SHIBUYA (1979) sur le B.O. de Gecko stimulé par des odeurs d'acétate d'amyle ont montré que les activités électriques spontanées et évoquées sont déprimées en présence de GABA exogène, et ce essentiellement au niveau de la couche plexiforme externe. Les effets du GABA au niveau de la couche glomérulaire sont moins nets. Malgré cela d'autres études devaient démontrer, par l'application de GABA au niveau du nerf olfactif ou de la couche glomérulaire, que le GABA pouvait jouer un rôle capital dans le processus d'atténuation de la transmission du message

afférent. Ainsi, JAHR et NICOLL (1981) en travaillant sur une préparation de B.O. de grenouille *in vitro*, ont-ils démontré que le GABA avait une action dépolarisante sur les fibres du nerf olfactif mais que cette action semblait insensible à l'antagonisme de la picrotoxine (un antagoniste des récepteurs GABA_A).

L'action du GABA sur les membranes postsynaptiques est généralement caractérisée par une baisse de la résistance membranaire, une augmentation de la conductance vis-à-vis des ions chlore et le blocage de la réponse par des agents pharmacologiques tels que la picrotoxine et la bicuculline.

Au niveau de la synapse dendrodendritique mitrale-granule, l'action du GABA ne diffère pas de celle observée dans les autres régions du S.N. Au niveau de cette synapse les potentiels postsynaptiques inhibiteurs (PPSI) provoqués par une stimulation antidromique du tractus olfactif latéral (YAMAMOTO *et al*, 1963; MORI *et al*, 1981) ont trois composantes dont une très tardive pouvant durer plusieurs secondes (JAHR et NICOLL, 1980; NOWYCKY *et al*, 1981). Les composantes initiales reflètent l'inhibition GABAergique de la cellule mitrale et sont bloquées par la bicuculline et par une réduction de la concentration extracellulaire en chlore; le potentiel tardif ne semble pas, quant à lui, être de nature GABAergique car il n'est associé à aucune augmentation de conductance membranaire (NOWYCKY *et al*, 1981). La nature de ce potentiel n'a pas encore été précisée (MORI, 1987).

L'étude du fonctionnement de la synapse granule-mitrale (RALL et SHEPHERD, 1968; JAHR et NICOLL, 1980) devait consacrer la notion d'inhibition latérale dont MATH et DAVRAINVILLE (1980) ont précisé, par leurs études électrophysiologiques, la nature et la maturation ontogénétique.

Au niveau glomérulaire, l'approche pharmacologique du processus de compression dynamique des messages afférents s'est ébauchée par la tentative de démonstration de l'existence dans le bulbe olfactif d'un mécanisme de dépolarisation des afférences primaires (JAHR et NICOLL, 1981).

Nous avons essayé, en partant des données électrophysiologiques sus-citées et en nous basant sur les données anatomiques concernant la maturation du bulbe olfactif (HINDS et HINDS, 1976a,b; BRUNJES et FRAZIER, 1986) qui ont démontré que la formation des synapses est plus précoce au niveau glomérulaire qu'au niveau plexiforme, de voir si

l'inhibition GABAergique telle qu'elle a été définie au niveau plexiforme est extrapolable au niveau glomérulaire.

Nos résultats font apparaître que l'application iontophorétique de GABA dans le B.O. du rat adulte se traduit par une dépression des potentiels extracellulaires et une élévation de l'activité potassique extracellulaire aussi bien au niveau de la couche glomérulaire qu'au niveau plexiforme. Cette variation de aK en réponse au GABA a été démontrée dans plusieurs structures comme le ganglion de la racine dorsale de la moelle épinière (DESARMENIEN *et al*, 1984; DESCHENES et FELTZ, 1976), dans le lobe intermédiaire de l'hypophyse (LOEFFLER *et al*, 1982), dans l'hippocampe (HAMON et HEINEMANN, 1986), dans les ganglions d'Aplysie (MATSUMOTO *et al*, 1986) etc..., cependant, elle serait une conséquence indirecte de l'activation des récepteurs GABA dont la principale incidence est une ouverture de canaux chlore (DESCHENES et FELTZ, 1976; SYKOVA, 1983; MATSUMOTO *et al*, 1986). Ainsi, l'efflux actif de chlore est compensé par un efflux passif de potassium; ce dernier favorisera le rétablissement de l'électroneutralité des espaces intra- et extra- cellulaires (DESCHENES et FELTZ, 1976; KRNJEVIC, 1976; SYKOVA, 1983).

Au niveau du bulbe olfactif adulte, les réponses au GABA sont atténuées, dans une lagre mesure, par la bicuculline au niveau de la couche plexiforme externe (FELIX et McLENNAN, 1971; McLENNAN, 1971). Au niveau glomérulaire, le même mécanisme semble prendre place à l'entrée du bulbe, vraisemblablement au niveau de la synapse périglomérulaire-mitrale.

L'application de 100 nA de GABA se traduit par une élévation de aK dont l'amplitude moyenne est de l'ordre de la millimole. Cette action du GABA sur aK ne se maintient pas pendant toute la durée de l'application iontophorétique; en effet, après 5 à 10 sec., la réponse K décline progressivement traduisant probablement une désensibilisation des récepteurs GABA activés (DESARMENIEN, 1984). La dépression de la fréquence de décharge des cellules mitrales pendant l'application du GABA confirme le rôle inhibiteur du GABA dans le bulbe olfactif.

L'action de la bicuculline semble avoir une étendue plus large car elle annule les effets du GABA en déprimant les potentiels inhibiteurs (NOWYCKY *et al*, 1981) mais provoque également une activation de la décharge des deutoneurons bulbaires d'où un accroissement des mouvements potassiques vers la phase extracellulaire.

La découverte d'un second récepteur pour le GABA, le récepteur GABA_B (BOWERY *et al*, 1980; HILL et BOWERY, 1981) activé aussi bien par le GABA que par le baclofène (LIORESAL®, agent antispastique), a permis de caractériser d'autres conductances impliquées dans l'activation du récepteur GABA, en l'occurrence des conductances calciques et potassiques (HILL et BOWERY, 1981; NEWBERRY et NICOLL, 1984). L'activation du récepteur GABA_B semble jouer un rôle dans l'inhibition présynaptique et ce en relation avec la position généralement présynaptique de ce récepteur (COLLINS *et al*, 1982, sur le cortex olfactif du rat).

L'application iontophorétique de baclofène chez le rat provoque, comme nous l'avons vu, une réponse semblable à celle observée avec le GABA, à savoir une élévation de aK et une dépression des potentiels extracellulaires. Cependant, l'examen de l'allure des réponses montre que le temps d'installation de la réponse K au baclofène est supérieur à celui de la réponse au GABA. Par ailleurs, la réponse au baclofène au niveau de aK et de l'activité électrique neuronale se prolonge bien au-delà du temps d'application. La persistance de l'action dépresssive du baclofène est probablement due d'une part au prélèvement de ce composé qui est moins efficace que pour le GABA et d'autre part à l'absence de phénomène de désensibilisation des récepteurs GABA_B (DESARMENIEN, 1984; HEADLEY *et al*, 1980). Cette persistance des réponses au baclofène a également été observée dans l'hippocampe (NEWBERRY et NICOLL, 1984).

*** Maturation de l'inhibition GABAergique**

L'étude de la maturation ontogénétique de l'inhibition GABAergique dans le B.O. a montré que cette dernière était présente chez le rat nouveau-né (MATH, 1984) mais qu'elle subissait d'importants changements durant la période postnatale et ce en relation avec la mise en place des synapses inhibitrices (KOSAKA *et al*, 1987a; MAIR *et al*, 1982b; MATH et DAVRAINVILLE, 1980).

La principale constatation à laquelle a abouti notre étude réside dans la différence de sensibilité des zones glomérulaire et plexiforme à l'action de la bicuculline vis-à-vis des effets inhibiteurs du GABA pendant les premiers jours de vie périnatale. En effet, nous avons constaté une quasi-absence de réponse à la bicuculline dans la couche glomérulaire du rat âgé de 0 à 2 jours

P.N. La bicuculline appliquée avec le GABA chez les animaux de cet âge n'abolit pas systématiquement les effets inhibiteurs du GABA au niveau glomérulaire; appliquée seule elle ne provoque ni variation de aK ni augmentation de la fréquence de décharge des cellules.

L'existence au niveau glomérulaire de réponses au GABA et au baclofène comparables à celles observées dans la couche plexiforme externe nous fait dire que les récepteurs GABA présents dans cette zone sont insensibles à la bicuculline. Ces observations nous amènent à penser que les récepteurs GABA qui prédominent au niveau du site de terminaison des afférences primaires sont du type GABA β chez le rat nouveau-né.

L'installation définitive des réponses à la bicuculline au niveau glomérulaire commence à partir du 2^{ème} jour P.N. coïncidant ainsi avec le début de la mise en place de synapses fonctionnelles entre les cellules mitrales et périglomérulaires. Nous en déduisons que les récepteurs GABA β sont probablement distribués présynaptiquement sur les terminaisons du N.O. Cette suggestion va, d'ailleurs, dans le sens des résultats présentés par POTAPOV (1985) qui a démontré une inhibition de la transmission synaptique dans le glomérule de grenouille par le baclofène. Une localisation présynaptique des récepteurs GABA β a, également, été rapportée dans le cortex olfactif (COLLINS *et al*, 1982).

A partir du 2^{ème} jour P.N., les réponses bicuculline-sensibles et baclofène-dépendantes coexistent au niveau glomérulaire comme c'est le cas dès la naissance au niveau plexiforme.

DISCUSSION GENERALE
ET
CONCLUSION

DISCUSSION GENERALE ET CONCLUSION

Les résultats rapportés dans cette thèse et les interprétations que nous en avons données peuvent, à juste titre, paraître incomplets. Ayant conscience du caractère préliminaire de nos résultats et de l'aspect spéculatif de certaines interprétations, nous nous devons donc d'adresser, dans ce chapitre, quelques réserves quant au contenu de notre thèse.

A- TECHNIQUES

La principale technique de mesure utilisée dans ce travail pour déterminer les fluctuations de la composition ionique du milieu extracellulaire repose sur l'emploi de micropipettes de verre transformées en électrodes ion-sensitives par un traitement adéquat de la surface interne du verre (voir Matériels et Méthodes). Le choix de cette technique nous a été dicté par le fait qu'elle est la seule méthode de mesure directe et dynamique des flux ioniques à l'échelle cellulaire et tissulaire. En effet, des méthodes plus récentes comme le *patch-clamp* ne peuvent être appliquées, malgré leur haute résolution, qu'aux canaux ioniques, d'où une importante restriction du champ d'investigation.

L'utilisation de ces micropipettes permet une mesure directe de l'activité d'un électrolyte donné dans le milieu d'enregistrement. Grâce à la sensibilité et à la sélectivité de la méthode, la valeur lue par l'électrode peut être considérée comme très fiable.

Malgré les avantages certains que procure la technique des électrodes ion-sensitives (WALKER, 1971; WALKER et BROWN, 1977; THOMAS, 1978), notamment pour la mesure des fluctuations les plus subtiles de la composition ionique intra- ou extra-cellulaire (WALKER, 1981), il convient de rappeler que les variations d'activité ionique détectées par ces électrodes doivent être manipulées avec précaution. En effet, plusieurs facteurs contribuent à fausser la valeur réelle de la fluctuation de l'activité ionique.

Ainsi, la pointe de la microélectrode peut provoquer des microlésions dans les tissus nerveux qu'elle empale créant de ce fait des espaces morts qui, compte tenu du diamètre externe de la micropipette, sont nettement plus

larges que les espaces intercellulaires. Ces espaces morts constituent, par conséquent, des compartiments vers lesquels les ions produits par l'activité neuronale peuvent diffuser (ENG et KOCSIS, 1987). De plus, le matériel intracellulaire des éléments neuronaux lésés peut se répandre dans le compartiment extracellulaire.

Par ailleurs, les K-MIS, par exemple, ont un temps de réponse assez lent (10 msec pour LUX, 1974; 100 à 200 msec dans nos travaux) de sorte qu'il ne permet pas la mise en évidence de phénomènes transitoires dont la durée est inférieure à 0.2 sec. Ce temps de réponse ne constitue pas un inconvénient majeur pour nous qui étudions des phénomènes dont la durée est largement supérieure à la seconde.

De plus, la résistance d'entrée d'une MIS peut se situer autour de 10^9 à $10^{12} \Omega$; cette résistance très élevée peut favoriser l'installation d'interférences, notamment celles produites par l'électricité statique. La plus ou moins bonne sélectivité de la résine utilisée, le choix de la solution de remplissage de la pipette et la dimension de la pointe de celle-ci sont autant de facteurs contribuant, par les potentiels de jonction et de pointe (THOMAS, 1978), à la distorsion de la différence de potentiel lue par l'électrode.

La composition électrolytique et le pH du milieu peuvent introduire une interférence au niveau du signal détecté par la MIS. En effet, une K-MIS est sensible à l'interférence introduite par les ions Na^+ et le pH du milieu notamment. La sélectivité(K) pour l'ion principal (K^+) vis-à-vis de l'ion secondaire (Na^+ , H^+ ...) est relativement bonne. Ainsi $K_{\text{K}^+,\text{Na}^+}$ est de l'ordre de 0.02 et $K_{\text{K}^+,\text{H}^+}$ est de l'ordre de 0.01 pour une bonne électrode K-MIS (VYSKOCIL *et al*, 1972). Les Ca-MIS ne souffrent des interférences des ions Mg^{++} que lorsqu'elles sont utilisées pour les enregistrements intracellulaires où la concentration en Ca^{++} est très nettement inférieure à celle du Mg^{++} (THOMAS, 1978).

Quel que soit le caractère relatif des variations lues par l'électrode ion-sensible, la technique demeure, grâce à son aspect dynamique, le meilleur moyen d'évaluation de l'activité ionique *in vivo*. C'est principalement pour cette raison que nous avons choisi d'utiliser la MIS comme instrument de mesure conjugué le cas échéant à d'autres techniques.

Malgré les inconvénients de la méthode, son utilisation (originale) dans l'épithélium s'est révélée être aussi utile que pertinente pour l'étude des changements d'activité ionique faisant suite à la stimulation odorante; elle devrait permettre d'obtenir davantage de données sur l'environnement des

NRC. Par ailleurs, cette même méthode nous a permis de réhausser la notion d'unité glomérulaire par l'apport de données originales s'inscrivant dans le cadre de l'encodage bulbaire des informations olfactives.

B- PRINCIPAUX RESULTATS

Dans la première partie, nous avons évalué la nature et la magnitude des variations des activités potassique et calcique extracellulaires au niveau de l'épithélium olfactif de grenouille en réponse à la stimulation odorante de la surface réceptrice. Ces variations peuvent être résumées comme suit:

- Les variations potassiques comportent une élévation de aK dans le mucus et dans la partie apicale de l'épithélium et une baisse de aK ouabaine-sensible suivie d'une élévation "off" de aK à la base de l'épithélium.
- Les variations calciques se présentent sous forme d'une baisse de aCa contemporaine de l'EOG suivie d'une élévation de aCa dans la région proximale; dans la partie distale, la réponse consiste en une baisse cobalt-sensible de aCa.

Les deux réserves majeures que nous pouvons émettre concernant cette première partie sont les suivantes:

- La première concerne l'utilisation de l'EOG comme indicateur de l'activité épithéliale, utilisation qui peut introduire des erreurs d'évaluation et d'interprétation. Compte tenu du renouvellement permanent des NRC, une partie de l'EOG enregistré chez l'adulte est certainement due à l'activité de NRC immatures. En effet, l'EOG peut être enregistré chez l'embryon, il est alors, composé de courants issus de NRC immatures qui ne sont ni sélectifs vis-à-vis des odeurs ni connectés au bulbe (GESTELAND *et al*, 1982).
- La seconde met en cause l'odeur utilisée dans nos travaux. Ainsi, l'utilisation d'une seule odeur à deux concentrations seulement n'est, évidemment, pas suffisante pour tirer des conclusions qui puissent être généralisées à tout le système olfactif périphérique. Outre la sélectivité des NRC matures à différentes odeurs, il ne faut pas perdre de vue l'aspect multidimensionnel de l'interaction stimulus-récepteur qui est déterminant dans la définition de la qualité de l'odeur, nous en prenons pour preuve les modifications des décours des variations ioniques pour les deux concentrations utilisées. De plus, il faut tenir compte des variations des réponses des NRC lors de l'application de mélanges binaires ou tertiaires de

différents stimuli (CAPRIO *et al*, 1989) et de l'adaptation des récepteurs (BAYLIN et MOULTON, 1979) qui sont autant de facteurs pouvant favoriser ou déprimer l'activation des NRC (CAPRIO *et al*, 1989), donc faire varier la nature et le déroulement temporel des flux ioniques détectés dans l'épithélium.

Dans la seconde partie, nous nous sommes intéressés au bulbe olfactif où nous avons essayé de mettre en évidence certains aspects relatifs au fonctionnement de l'unité glomérulaire. Les données obtenues sont diverses mais recoupent toutes l'idée d'une localisation intraglomérulaire des phénomènes de compression des messages afférents. Les principaux résultats peuvent être résumés ainsi:

- La stimulation répétitive des fibres du NO provoque l'apparition d'un pic K dans les glomérules olfactifs accompagnée d'une chute importante de la fréquence des potentiels extracellulaires. La dépendance du pic K vis-à-vis de la composition du milieu extracellulaire a été examinée à travers l'application d'ions ou d'agents modulant le fonctionnement neuronal. Elle a montré que différents facteurs (blocage de la transmission synaptique, perturbation du métabolisme glucidique, présence de neurotransmetteurs putatifs, etc...) pouvaient influencer l'apparition du pic K.
- La localisation intraglomérulaire de ce phénomène est démontrée par l'absence de diffusion du K exogène dans la couche glomérulaire. Un argument supplémentaire est fourni par l'existence d'une concentration tissulaire d'activité Na,K-ATPase plus élevée à ce niveau.
- Sur un autre plan, l'étude de l'évolution ontogénétique de l'inhibition GABAergique nous a conduit à démontrer que seuls les récepteurs de type GABA B sont présents au niveau glomérulaire chez le nouveau-né.

Deux critiques principales sont à émettre concernant cette seconde partie de notre travail:

- Premièrement, il nous paraît essentiel de souligner le caractère parcellaire des résultats relatifs à l'examen de l'influence des neurotransmetteurs sur le pic K. Malgré ce constat, une conclusion peut, d'ores et déjà, être tirée; en effet, cette influence ne peut être évoquée à travers l'unique action individuelle des différents neurotransmetteurs testés. Pour s'en convaincre, il suffit de rappeler que l'action simultanée du GABA et de la dopamine s'est révélée être plus dépressive vis-à-vis du pic K que l'application de GABA et

de DA séparément. Une explication à ce résultat peut être esquissée en partant des résultats d'études immunohistochimiques récentes (KOSAKA *et al*, 1987a,b) qui ont démontré que les cellules périglomérulaires contenaient du GABA et de la DA.

Par ailleurs, il convient de s'interroger sur la signification de ces influences et sur les raisons qui font que l'action des neurotransmetteurs testés est soit facilitatrice vis-à-vis du pic K, soit dépressive, soit facilitatrice et/ou dépressive selon la dose appliquée (cf GABA, DA, 5-HT).

S'agissant de l'origine de l'atténuation de la transmission glomérulaire, une implication des cellules périglomérulaires a d'abord été évoquée (FREEMAN, 1974b) avant que l'auteur ne conclue que l'atténuation résultait probablement d'une action indirecte de la transmission synaptique. En effet, la notion d'atténuation glomérulaire se réfère non à une inhibition mais à un blocage de la transmission au niveau des dendrites apicales des cellules mitrales, car le phénomène ne s'accompagne pas d'une hyperpolarisation des membranes postsynaptiques glomérulaires (FREEMAN, 1974a,b).

Dans ce contexte, il est hasardeux d'affirmer que l'application de certains neurotransmetteurs lors de la stimulation du NO empêche la formation du pic K car il y a rétablissement ou renforcement de la transmission synaptique. Des études supplémentaires sont, évidemment, nécessaires pour mieux appréhender ce problème.

- Deuxièmement, la caractérisation des récepteurs GABA dans le bulbe souffre de quelques faiblesses d'ordre expérimental. En effet, l'examen des variations calciques extracellulaires pendant l'application du GABA ou de baclofène nous aurait certainement permis de mieux caractériser les récepteurs GABA_B. Par ailleurs, l'utilisation des flux potassiques pour caractériser l'activation des récepteurs GABA_A n'est pas très judicieuse.

Sans remettre en cause nos résultats, nous pensons, donc, que l'utilisation simultanée de K-MIS et de Ca-MIS et l'application d'analogues du GABA et du baclofène (LOEFFLER *et al*, 1982; SCHLICHTER *et al*, 1984, HEINEMANN *et al*, 1984) auraient été plus pertinentes pour montrer la présence et la distribution des récepteurs GABAergiques sur les terminaisons nerveuses glomérulaires.

C- DISCUSSION GENERALE

1- IMAGE OLFACTIVE

Les neurorécepteurs sont responsables aussi bien de la détection des molécules odorantes que de la discrimination entre différents stimuli odorants. La compréhension des séries d'événements se déroulant entre le moment où la molécule odorante est détectée et le moment où commence la transmission d'impulsions électriques au cerveau passe par la détermination de la nature des flux ioniques accompagnant l'activation des neurorécepteurs. Cette détermination peut se faire soit par la caractérisation des conductances membranaires activées au niveau de la membrane du neurorécepteur (MAUE et DIONNE, 1987; TROTIER, 1986) soit par la mesure directe des flux ioniques transépithéliaux .

N'étant initialement qu'un ensemble de molécules ayant des propriétés odorantes, le stimulus olfactif acquiert, en interagissant avec la surface réceptrice, une dimension spatiale qui autorise à parler en termes d'image ou de motifs d'activation.

L'introduction de la notion de motifs spatio-temporels d'activation des neurorécepteurs (ADRIAN, 1950) a permis d'établir que le codage spatial est dû aux contraintes physiques du système récepteur, à savoir le flux aérien (de la narine vers la choane) et la nécessité pour les molécules de traverser le mucus pour atteindre les sites récepteurs (théorie chromatographique, motifs spatiaux imposés MOZELL, 1971). Les résultats obtenus par application de bouffées de butanol radioactif par la voie naturelle (HORNUNG *et al*, 1975) montrent que les molécules se distribuent le long du gradient s'établissant entre la narine externe et la choane et qu'elles suivent le gradient créé par l'existence de différents temps de rétention dans le mucus. Ces auteurs suggèrent que la distribution des motifs d'activation, et par conséquent la différenciation chromatographique pourraient être responsables de certains mécanismes de la discrimination olfactive.

Le rôle joué par les cations dans les étapes initiales de la perception olfactive est encore sujet à controverses. Tantôt, il est formulé en termes de liaison des cations avec le site récepteur pour favoriser le maintien du complexe stimulus-récepteur dans un état actif (YOSHI et KURIHARA, 1983) sans que les modifications de perméabilité membranaire vis-à-vis d'ions spécifiques ne soient impliquées dans la dépolarisation des NRC (KASHIWAYANAGI *et al*, 1987); tantôt, les cations sont rendus directement

responsables de l'activation et de l'inactivation des NRC (FIRESTEIN et WERBLIN, 1987, 1989; LABARCA *et al*, 1988; MAIR *et al*, 1982a; MAUE et DIONNE, 1987; TROTIER et MAC LEOD, 1986; TROTIER, 1986). Par ailleurs, il a été montré que l'application d'AMPc au niveau de *patches* de NRC provoquait une augmentation de la conductance membranaire (NAKAMURA et GOLD, 1987) et que l'activation de l'adénylate cyclase, par l'application de forskoline, mimait les effets de la stimulation odorante (PACE *et al*, 1985).

Dans le cours de l'interprétation de nos résultats, nous avons essayé de nous baser sur des données obtenues par d'autres techniques ou dans des structures autres que l'épithélium olfactif. Nous avons, en effet, fait référence principalement aux enregistrements intracellulaires, qui ont précisé les propriétés électriques des cellules épithéliales (TROTIER et MAC LEOD, 1983, 1986), aux enregistrements en patch clamp, qui ont caractérisé plusieurs canaux ioniques dans les NRC isolés (FIRESTEIN et WERBLIN, 1987, 1989; LABARCA *et al*, 1988; MAUE et DIONNE, 1987; TROTIER, 1986) et enfin aux résultats obtenus dans la rétine par la même méthode que la nôtre (DICK et MILLER, 1985).

Ce cheminement est certainement critiquable car il peut amener à commettre des erreurs d'interprétation. Il convient, donc, de prendre avec toute la prudence qui s'impose le parallèle que nous avons fait entre les variations d'activité ionique extracellulaire que nous avons enregistrées et l'activation des canaux ioniques dans les NRC, parce que les rôles spécifiques de ces différents canaux n'ont pas encore été précisés; de plus, les NRC ne sont pas les seules sources possibles des flux ioniques mesurés dans l'épithélium. En outre, si nous avons évoqué la rétine, c'est à cause des similitudes de procédure (utilisation de K-MIS) et de décours temporel et spatial des variations de aK que nous avons enregistrées avec celles enregistrées au niveau de la rétine (DICK et MILLER, 1985). Il est évident que nous ne pouvons pas étendre la comparaison rétine-épithélium olfactif au delà de l'analogie, dûe à leur nature gliale, entre la cellule de Müller et la cellule sustentaculaire (TROTIER et MAC LEOD, 1986). Cependant, les études biochimiques (NAKAMURA et GOLD, 1987) ont montré que les voies métaboliques intracellulaires (AMPc, GMPc) impliquées dans la transduction olfactive n'étaient pas très différentes de celles responsables de la transduction visuelle; ceci autorise donc certaines comparaisons entre les deux modèles.

Pour conclure, nous proposons, à titre d'hypothèse de travail, que l'implication des cations dans la perception olfactive soit examinée de manière plus approfondie *in vivo* avant de statuer sur le rôle exact des cations dans la dépolarisation des NRC et dans la formation de l'EOG. Il s'agit, en effet, de savoir si les mouvements ioniques sont à la base de la dépolarisation des NRC (FIRESTEIN et WERBLIN, 1987, 1989; LABARCA *et al*, 1988; SHEPHERD *et al*, 1986) ou sont-ils uniquement une manifestation secondaire de cette dépolarisation qui serait, alors, provoquée par des changements de fluidité membranaire (KASHIWAYANAGI *et al*, 1987) ou des variations de potentiel interfacial qui se propagerait électrotoniquement jusqu'à l'axone du NRC (YOSHI et KURIHARA, 1983).

2- UNITE GLOMERULAIRE

Les P.A. issus de plusieurs neurorécepteurs sont organisés selon un motif spatio-temporel d'activation dépendant de la nature de l'odeur appliquée à l'épithélium (MOZELL, 1971). Ces P.A. arrivent au niveau du bulbe olfactif avec une dispersion temporelle due à la différence de maturation, donc de vitesse de conduction des fibres nerveuses qui les véhiculent (GESTELAND *et al*, 1982). Au niveau de l'entrée du bulbe, un mécanisme d'inhibition localisé au niveau des glomérules contrôle l'amplitude des signaux afférents créant ainsi, un contraste local et spatial au niveau glomérulaire. Ainsi, ce contrôle automatique du volume des signaux afférents prend part au codage des informations olfactives provenant de l'épithélium, codage qui est parachevé au niveau des dendrites basales des deutoneurons bulbaires par la voie de l'inhibition récurrente.

Pour cette étude nous avons eu plus de points de repère et de données sur lesquels baser notre interprétation. Ainsi avons-nous fait référence à des phénomènes tels que l'atténuation de la transmission glomérulaire (FREEMAN, 1974a,b), la dépolarisation des afférences primaires (JAHR et NICOLL, 1981) ou encore, l'inhibition présynaptique (VORNKOV et GUSEL'NIKOVA, 1967; JAHR et NICOLL, 1981). Ces différentes études ont désigné le glomérule olfactif comme site privilégié au niveau duquel ces phénomènes se produisent et les ions potassium comme vecteur probable de leur réalisation.

Il semble maintenant acquis que le glomérule olfactif représente, de par sa position anatomique et sa géométrie, une unité fonctionnelle

(LEVETEAU et MAC LEOD, 1966; JOURDAN, 1984) pouvant contribuer, par une intégration locale des signaux afférents, au processus de discrimination olfactive (GRAZIADEI et MONTI-GRAZIADEI, 1986).

Les images obtenues par le marquage, au 2-désoxyglucose, de glomérules olfactifs isolés (JOURDAN *et al*, 1980; LEON, 1987) attestent de l'importance de ces structures dans l'encodage local des signaux afférents.

L'approche que nous avons présentée et qui a consisté d'une part, à enregistrer les modifications locales du métabolisme ionique et, d'autre part, à caractériser la nature des récepteurs GABAergiques présents à l'entrée du bulbe à un moment où les glomérules ne sont pas encore bien individualisés, rejoint parfaitement cette idée.

Sur le plan comportemental, le marquage au 2-désoxyglucose d'un ensemble glomérulaire appelé "complexe glomérulaire modifié" (JOURDAN, 1984) permet d'assigner à ce complexe un rôle primordial chez le jeune animal, notamment dans l'apprentissage d'une préférence pour l'odeur maternelle (LEON, 1987). Cet aspect est réhaussé par la visualisation très récente (LaMANTIA et PURVES, 1989) de la formation glomérulaire qui est très intense pendant la période postnatale.

Pour conclure, nous pouvons dire que le nombre très élevé de NRC et leur organisation topographique sont témoins d'une grande redondance participant à la définition de l'auto-organisation du système olfactif périphérique, c'est à dire à sa capacité de créer des images sensorielles spatialement organisées. Certes, la redondance n'est pas spécifique au système olfactif périphérique mais celui-ci constitue un excellent exemple pour évoquer ce phénomène. En effet, le renouvellement permanent des récepteurs provoque une modification voire une désorganisation transitoire des images olfactives. Si les propriétés intrinsèques de l'épithélium lui permettent de "rattraper" cette désorganisation, celle-ci n'est en fait réellement compensée qu'au niveau des glomérules. A cause de la convergence massive de milliers de fibres nerveuses vers un même glomérule, et de l'augmentation des spécifications neuroniques, la redondance y est nettement diminuée et le message stabilisé. Ainsi passe-t-on d'une image olfactive initiale diffuse, pour cause de faible spécificité des NRC (recouvrements des motifs d'activation, NRC immatures...) à une image bulbaire mieux organisée dont les "contours" sont bien délimités. Il est donc légitime de penser que les

glomérules sont les premiers responsables de la haute définition de l'image olfactive au niveau bulbaire.

D- CONCLUSION

La stimulation de l'épithélium olfactif, par une odeur donnée, active, selon la théorie des motifs spatiaux (ADRIAN, 1950; MOZELL, 1971), un certain nombre de récepteurs localisés au niveau de zones spécifiques de la surface sensorielle. Une image sensorielle est ainsi créée par l'organe olfactif lui-même, car les molécules odorantes ne sont pas organisées, au départ, en motifs spatiaux comme l'est un stimulus visuel, par exemple (MOULTON, 1976).

L'attribution du vocable "image sensorielle" aux signaux olfactifs doit être maniée avec précaution car la stimulation olfactive est loin d'être contrôlable avec précision comme pourrait l'être un stimulus visuel ou auditif, par exemple. En effet, les différences de sensibilité vis-à-vis des odeurs, de récepteurs localisés dans différentes régions de l'épithélium (motifs spatiaux inhérents), les différences de distribution des molécules odorantes dans la cavité olfactive (motifs spatiaux imposés) et les écarts entre les temps de rétention des substances odorantes dans le mucus interviennent dans la définition de la qualité et de l'intensité de la discrimination olfactive (BAYLIN, 1979; HORNUNG *et al*, 1975; MOULTON, 1976).

Nos résultats démontrent une intervention directe des flux ioniques, surtout calciques, dans la genèse de l'image sensorielle des odeurs et une régionalisation de ces flux le long de l'assise épithéliale avec des différences notables entre la surface et la base de l'épithélium.

L'image olfactive est, ensuite, projetée vers les deutoneurones bulbaires au niveau des glomérules olfactifs qui sont organisés, comme les neurorécepteurs, en foyers localisés à la surface bulbaire (COSTANZO et O'CONNELL, 1980; JASTERBOFF *et al*, 1984; STEWART *et al*, 1979). En effet, l'organisation spatiale des récepteurs périphériques induit une projection spatialement organisée du message afférent sur les neurones bulbaires et sur les cellules centrales; cette projection procède du codage et de la propagation de l'information olfactive (COSTANZO et O'CONNELL, 1980). Cependant, l'image olfactive n'est pas toujours transférée intacte aux cellules bulbaires à travers les synapses glomérulaires. Ainsi, certaines cellules bulbaires reçoivent des signaux provenant de champs récepteurs étalés; elles sont impliquées dans le codage quantitatif des odeurs, les autres ont des champs récepteurs restreints et sont impliquées dans le codage

qualitatif (COSTANZO et O'CONNELL, 1980). Outre cet aspect, le codage procède, avant tout, de la compression dynamique du message sensoriel qui transite par le bulbe olfactif.

Nos résultats mettent en évidence l'implication de l'accumulation extracellulaire de K^+ et de l'activation des récepteurs GABAergiques dans le processus de compression dynamique du message afférent par atténuation de la transmission glomérulaire (FREEMAN, 1974b).

A la lumière des données puisées dans la littérature et compte tenu de nos résultats, nous pouvons penser que la caractérisation des mouvements ioniques accompagnant les processus de transduction et de codage des signaux olfactifs pourra, à la longue, nous permettre d'élucider les mécanismes de perception olfactive et les processus physico-chimiques sous-jacents. Pour atteindre cet objectif ambitieux, l'emploi de techniques plus fines et plus précises comme les enregistrements intracellulaires ou les études en patch-clamp (MAUE et DIONNE, 1987; TROTIER, 1986) est susceptible de mieux répondre à des questions que notre étude n'a fait qu'ébaucher.

Par ailleurs, il est clair que l'absence de liant entre l'étude des mouvements ioniques dans l'épithélium et celle faite au niveau du bulbe rend ce travail incomplet. Cependant, nous avons maintes fois débattu de la question et nous pensons que la stimulation intensive de l'épithélium olfactif pourrait induire un phénomène du type pic K^+ dans les glomérules, comme nous l'avait suggéré le Professeur G.M. SHEPHERD de l'université de YALE. Ce problème constitue l'une des perspectives par lesquelles nous aimerions approfondir ce travail.

Enfin, est-il besoin de rappeler que l'élargissement du champ d'investigation à des disciplines telles que la psychophysique ou l'éthologie ne pourra qu'être profitable à toutes les parties concernées.

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

ADRIAN, E.D. (1950)

Sensory discrimination with some recent evidence from olfactory organ.

Br. Med. Bull. 6 330-333.

ALGER, B.E. & NICOLL, R.A. (1982)

Pharmacological evidence for two kinds of GABA receptors on rat hippocampal pyramidal cells studied in vitro.

J. Physiol. 328 125-141.

ALLISON, A.C. (1953)

The morphology of olfactory system in vertebrates.

Biol. Rev. 28 195-244

ATTERWILL, P.K.; REID, J. & ATHAYDE, C.M. (1985)

Effect of thyroid status on development of different molecular forms of Na, K-ATPases in rat brain.

Molec. Cell. Endocrinol. 40 149-158.

AUSTIN, L.; RECASENS, M. & MANDEL, P. (1979)

GABA in the olfactory bulb.

J. Neurochem. 32 1473-1477.

BAGINSKI, E.S.; FOA, P.P. & ZAK, B. (1967)

Determination of phosphate : study of labile organic phosphate interference.

Clin. Chim. Acta. 15 155-158.

BAYLIN, F. (1979)

Temporal patterns and selectivity in the unitary responses of olfactory receptors in the tiger salamander to odor stimulation.

J. Gen. Physiol. 74 17-36.

BAYLIN, F & MOULTON, D.G. (1979)

Adaptation and cross-adaptation to odor stimulation of olfactory receptors in the tiger salamander.

J. Gen. Physiol. 74 37-55

BEN-ARI, Y.; KRNJEVIC, K. & REINARDT, W. (1979)

Hippocampal seizures and failure of inhibition.

Can. J. Physiol. Pharmacol. 57 1462-1466.

BLAXTER, T.J.; CARLEN, P.L.; DAVIES, M.F. & KUJTAN, P.W. (1986)

Gamma-aminobutyric acid hyperpolarizes rat hippocampal pyramidal cells through a calcium-dependent potassium conductance.

J. Physiol. 373 181-194.

BLOMSTRAND, C; & HAMBERGER, A. (1970)

Amino acid incorporation in vitro in proteins of neuronal and glial cell enriched fractions.

J. Neurochem. 17 1187-1195.

BOWERRY, N.G.; HILL, D.R.; HUDSON, A.L.; DOBLE, A.; MIDDLEMISS, D.N.; SHAW, J. & TURNBULL, M. (1980)

(-) baclofen decreases neurotransmitter release in mammalian CNS by an action at a novel GABA receptor.

Nature 283 92-94.

BRODERSON, S.H.; PATON, D.L. & STAHL, W.L. (1978)

Fine structural localization of potassium-stimulated p-nitrophenylphosphatase activity in dendrites of cerebral cortex.

J. Cell. Biol. 77 R13-R17.

BRONSTEIN, A.A. & LEONT'EV, V.G. (1972)

The content of sodium and potassium in the mucus covering the olfactory mucosa in vertebrates.

J. Evol. Biochem. Physiol. 8 580-585.

BRUNJES, P.C. & FRAZIER, L.L. (1986)

Maturation and plasticity in the olfactory system of vertebrates.

Brain Res. Rev. 11 1-45

CAPRIO, J. DUDEK, J. & ROBINSON II, JJ (1989)

Electroolfactogram and multiunit olfactory receptor responses to binary and trinary mixtures of amino acids in the channel catfish, *Ictalurus punctatus*.

J. Gen. Physiol. 93 245-262

CORDINGLEY, G.E. & SOMJEN, G.G. (1978)

The clearing of excess potassium from extracellular space in spinal cord and cerebral cortex.

Brain Research 151 291-306

COSTANZO, R.M. & O'CONNELL, R.J. (1980)

Receptive fields of second order neurons in the olfactory bulb of the hamster.

J. Gen. Physiol. 76 53-68

CURTIS, D.R.; LODGE, D.; BORNSTIEN, J.C. & PEET, M.J. (1981)

Selective effects of (-)baclofen on spinal synaptic transmission in the cat.

Exp. Brain Res. 42 158-170

CURTIS, D.R.; PERRIN, D.D. & WATKINS, J.C. (1960)

The excitation of spinal neurones by the iontophoretic application of agents which chelate calcium.

J. Neurochem. 6 1-20.

COLLINS, C.G.S.; ANSON, J. & KELLY, E.P. (1982)

Baclofen : effects on evoked field potentials and aminoacid neurotransmitter release in rat olfactory cortex slice.

Brain Research 238 371-383.

COLLINS, C.G.S.; ANSON, J. & PROBETT, G.A. (1985)

Excitatory and inhibitory effects of dopamine on synaptic transmission in the rat olfactory slice.

Brain Research 333 237-245.

CORRIGALL, W.A.; CRAIN, S.M. & BRONSTEIN, M.B. (1976)

Electrophysiological studies of fetal mouse olfactory bulb explants during development of synaptic functions in culture.

J. Neurobiol. 7 521-536.

DAVIES, J. (1981)

Selective depression of synaptic excitation in cat spinal neurons by baclofen.

Br. J. Pharmac. 72 373-384

DAVIS, B.J. & MACRIDES, F. (1983)

Tyrosine hydroxylase immunoreactive neurons and fibers in the olfactory system of the hamster.

J. Comp. Neurol. 214 427-440.

DESCHENES, M. & FELTZ, P. (1976)

GABA-induced rise of extracellular potassium in rat dorsal root ganglia : an electrophysiological study in vivo.

Brain Research 118 494-499.

DESARMENIEN, M. (1984)

Le GABA médiateur inhibiteur du couplage excitation-sécrétion. Caractéristiques des divers types de récepteurs identifiés sur les principaux groupes de neurones sensoriels primaires.

Thèse d'état. Université L. Pasteur. STRASBOURG.

DESARMENIEN, M.; FELTZ, P.; OCCHIPINTI, G.; SANTANGELO, F. & SCHLICHTER, R. (1984)

Coexistence of GABA_A and GABA_B receptors on Ad and C primary afferents.

Br. J. Pharmacol. 81 327-333.

DICK, E. & MILLER, R.F. (1985)

Extracellular K activity changes related to electroretinogram components. I- Amphibian (I-type) retinas.

J. Gen. Physiol. 85 885-909

DJAMGOZ, M.B.A. & LAMING, P.J. (1981)

Intracellular measurements of ionic activity.

TRENDS Neurosci. 4 280-284.

DOLPHIN, A.C. & SCOTT, R.H. (1986)

Inhibition of calcium currents in cultured rat dorsal root ganglion neurones by (-)baclofen.

Br. J. Pharmacol. 88 213-220.

DUNLAP, K. & FISCHBACH, G.D. (1981)

Neurotransmitters decrease the calcium conductance activated by depolarization of embryonic chick sensory neurons.

J. Physiol. (Lond.) 317 519-535.

ECCLES, (1964)

The physiology of synapses.

Springer. Berlin

ENG, D.L. & KOCSIS, L.D. (1987)

Activity-dependant changes in extracellular potassium and excitability in turtle olfactory nerve.

J. Neurophysiol. 57 740-754.

FARBMAN, A.I. (1986)

Prenatal development of mammalian olfactory receptor cells.

Chem. Senses 11 3-18.

FELIX, D; & Mc LENNAN, H. (1971)

Thes effects of bicuculline on the inhibition of mitral cells of the olfactory bulb.

Brain Research 25 661-664.

FINK, R.P. & HEIMER, L. (1967)

Two methods for selective impregnation of degenerating axons and their synaptic endings in the central nervous system.

Brain Research 4 369-374.

FIRESTEIN, S. & WERBLIN, F.S. (1987)

Gated currents in isolated olfactory receptor neurons of the larval tiger salamander.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84 6292-6296

FIRESTEIN, S. & WERBLIN, F.S. (1989)

Odor-induced membrane currents in vertebrate olfactory receptor neurons.

Nature 244 79-82

FREEMAN, W.J. (1974a)

Attenuation of transmission through glomeruli of olfactory bulb on paired shock stimulation.

Brain Research 65 77-90.

FREEMAN, W.J. (1974b)

Relation of glomerular neuronal activity to glomerular transmission attenuation.

Brain Research 65 91-107.

FOX, S.; KRNJEVIC, K.; MORRIS, M.E. PUIL, E. & WERMAN, R. (1978)

Action of baclofen on mammalian synaptic transmission.

Neuroscience 3 495-515

GAHWILER, B.H. & BROWN, D.A. (1985)

GABA B receptor activated K current in voltage clamped CA3 pyramidal cells in hippocampal cultures.
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 82 1558-1562

GALVAN, M. ; FORSTL, J. & ten BRUGGENCATE, G. (1981)

Extracellular K activity during electrical stimulation of rat sympathetic ganglia, vagus and optic nerves in vitro.
in SYKOVA, E.; HINK, P. & VYKLIČKY, L. (Eds), Ion-selective microelectrodes and their use in excitable tissues. Plenum, NEW YORK; pp 201-204

GERVAIS, R. & PAGER, J. (1983)

Olfactory bulb excitability selectivity modified in behaving rats after local 6-Hydroxydopamine treatment.
Behav. Brain Res. 9 165-179.

GESTELAND, R.C.; LETTVIN, J.Y. & PITTS, W.H. (1965)

Chemical transmission in the nose of the frog.
J. Physiol (Lond.) 181 525-559

GESTELAND, R.C.; YANCEY, R.A. & FARBMAN, A.I. (1982)

Development of olfactory receptor neuron selectivity in the rat fetus.
Neuroscience 7 3127-3136

GETCHELL, T.V. (1977)

Analysis of intracellular recordings from salamander olfactory epithelium.
Brain Research 123 275-286.

GRAZIADEI, P.P.C. & MONTI-GRAZIADEI, G.A. (1986)

Principles of organization of the vertebrate olfactory glomerulus: an hypothesis
Neuroscience 19 1025-1035

GRAZIADEI, P.P.C. & MONTI-GRAZIADEI, G.A. (1978)

Continuous nerve cell renewal in the olfactory system.
In M. JACOBSON (Ed.) Handbook of sensory physiology. IX-Development of sensory systems BERLIN, pp 55-83

GREEN, J.D.; MANCIA, M. & von BAUMGARTEN, R. (1962)

Recurrent inhibition in the olfactory bulb. I- Effects of antidromic stimulation of the lateral olfactory tract.

J. Neurophysiol. 25 467-488.

GUTNIK, M.J. & SEGAL, M. (1981)

Serotonin and GABA induced fluctuations in extracellular ion concentration in the hippocampal slice.

in SYKOVA, E.; HINK, P. & VYKLICKY, L. (Eds), Ion-selective microelectrodes and their use in excitable tissues. Plenum, NEW YORK; pp 261-265

HALASZ, N.; LJUNGDAHL, A.; HOKFELT, T., JOHANSsON, O.; GOLDSTEIN, M.; PARK, D. & BIBERFELD, P. (1977)

Transmitter histochemistry of the rat olfactory bulb. I- Immunohistochemical localization of monoamine synthetizing enzymes. Support for intrabulbar periglomerular dopamine neurons.

Brain Research 126 455-474.

HALASZ, N.; LJUNGDAHL, A. & HOKFELT, T. (1978)

Transmitter histochemistry of the rat olfactory bulb. II- Fluorescence histochemical, autoradiographic and electron microscopic localization of monoamines.

Brain Research 154 253-271.

HALASZ, N.; LJUNGDAHL, A. & HOKFELT, T. (1979)

Transmitter histochemistry of the rat olfactory bulb. III- Autoradiographic localization of [³H]-GABA.

Brain Research 167 221-240.

HALASZ, N. & SHEPHERD, G.M. (1983)

Neurochemistry of the vertebrate olfactory bulb.

Neuroscience 10 579-619.

HAMON, B. & HEINEMANN, U. (1986)

Effects of GABA and bicuculline on N-methyl-D-aspartate- and quisqualate- induced reductions in extracellular free calcium in area CA1 of hippocampal slice.

Exp. Brain Res. 64 27-36.

HARDING, J.W. & MARGOLIS, F.L. (1976)

Denervation in the primary olfactory pathway of mice. III- Effect on enzymes of carnosine metabolism.

Brain Res. 110 351-360

HEADLEY, P.M.; DESARMENIEN, M.; LINK, G. SANTANGELO, F. & FELTZ, P. (1980)

On the role of glial GABA uptake : studies with dorsal root ganglia.

Brain Res. Bull. 5 77-81.

HEINEMANN, U.; HAMON, B. & KONNERTH, A. (1984)

GABA and baclofen reduce changes in extracellular free calcium in area CA1 of rat hippocampal slices.

Neurosci. Lett. 47 295-300

HEINEMANN, U. & LUX, H.D. (1977)

Ceiling of stimulus-induced rises in extracellular potassium concentration in the cerebral cortex of cat.

Brain Research 120 231-249.

HENN, F.A.; HALJAMAE, H. & HAMBERGER, A. (1972)

Glial cell function : active control of extracellular K concentration.

Brain Research 43 437-443.

HINDS, J.W. & HINDS, P.L. (1976a)

Synaptic formation in the mouse olfactory bulb. I- Quantitative studies.

J. Comp. Neurol. 169 15-40

HINDS, J.W. & HINDS, P.L. (1976b)

Synaptic formation in the mouse olfactory bulb. II- Morphogenesis.

J. Comp. Neurol. 169 41-61

HOLLEY, A. & MAC LEOD, P. (1977)

Trnsduction et codage des informations olfactives chez les vertébrés.

J. Physiol. (Paris) 73 725-828.

HORNUNG, D.E.; LANSING, R.D. & MOZELL, M.M. (1975)

Distribution of butanol molecules along bullfrog olfactory mucosa.

Nature 254 617-618

HORNUNG, D.E.; YOUNGENTOB, S.L. & MOZELL, M.M. (1987)

Olfactory mucosa/air partitioning of odorants.
Brain Res. 413 147-154

JAHR, C.E. & NICOLL, R.A. (1980)

Dendrodendritic inhibition : demonstration with intracellular recording.
Science 207 1473-1475.

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. (1982)

An intracellular analysis of dendrodendritic inhibition in the turtle in vitro olfactory bulb.
J. Physiol.(Lond.) 326 213-234

JASTERBOFF, P.J.; PEDERSEN, P.E.; GREER, C.A.; STEWART, W.B. KAUER, S.; BENSON, T.E. & SHEPHERD, G.M. (1984)

Specific olfactory receptor populations projecting to identified glomeruli in the rat olfactory bulb.
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 81 5250-5254

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 Research 188 139-154.

JOURDAN, F. (1984)

Le codage spatial de l'information olfactive; Etude anatomofonctionnelle.
Thèse d'état. Université C. Bernard. LYON I.

KASHIWAYANAGI, M.; SAI, K. & KURIHARA, K. (1987)

Cell suspensions from porcine olfactory mucosa. Changes in membrane potential and membrane fluidity in response to various odorants.
J. Gen. Physiol. 89 443-457

KELLER, O.; UJEC, E.; MACHEK, J. & PAULIK, V. (1981)
Potassium changes elicited in the feline somatosensory cortex by a single stimulus to the peripheral nerve.

in SYKOVA, E.; HINK, P. & VYKLICKY, L. (Eds), Ion-selective microelectrodes and their use in excitable tissues. Plenum, NEW YORK; pp 273-278

KHAYARI, A. (1985)

Etude préliminaire de l'action de l'acide gamma-aminobutyrique sur la cellule mitrale dans le bulbe olfactif, au cours du développement postnatal du rat.

Mémoire de D.E.A. NANCY-I

KHAYARI, A.; MATH, F; & DAVRAINVILLE, J.L. (1988a)

Electrical stimulation of primary olfactory nerve induces two types of variations in the extracellular potassium activity within the glomerulus of the rat olfactory bulb in vivo.

Brain Res. 457 188-191

KHAYARI, A.; MATH, F; & DAVRAINVILLE, J.L. (1988c)

Evidence for an absence of K spread in the glomerular layer of the rat olfactory bulb.

Neurosci. Lett. 93 56-60

KHAYARI, A.; MESFIOUI, A.; MATH, F; & DAVRAINVILLE, J.L. (1990)

Na,K-ATPase in the rat olfactory bulb : evidence for a higher enzymatic activity in the glomerular layer.

Brain Res. 510 140-143

KHAYARI, A.; MATH, F. & TROTIER, D. (1989b)

Odorant-evoked potassium activity changes in the frog olfactory epithelium.

Brain Res. (à paraître)

KISHI, K.; MORI, K. & OJIMA, H. (1984)

Distribution of local axon collaterals of mitral, displaced mitral and tufted cells in the rabbit olfactory bulb.

J. Comp. Neurol. 225 511-526.

KOCSIS, J.D.; MALENKA, R.C. & WAXMAN, S.G. (1983)
Effects of extracellular potassium concentration on the excitability of parallel fibres of the rat cerebellum.

J. Physiol. 334 225-244.

KORYTA, J. (1981)

Theory of ion-selective electrodes.

in SYKOVA, E.; HINK, P. & VYKLICKY, L. (Eds), Ion-selective microelectrodes and their use in excitable tissues. Plenum, NEW YORK; pp 3-11

KOSAKA, K.; HAMA, K.; NAGATSU, I.; WU, J.Y.; OTTERSEN, O.P.; STORM-MATHISEN, J. & KOSAKA, T. (1987a)

Postnatal development of neurons containing both catecholaminergic and GABAergic traits in the rat main olfactory bulb.

Brain Res. 403 355-360

KOSAKA, T.; KOSAKA, K.; HAMA, K.; WU, J.Y. & NAGATSU, I. (1987b)

Differential effect of functional olfactory deprivation on the GABAergic and catecholaminergic traits in the rat main olfactory bulb.

Brain Res. 413 197-203

KRNJEVIC, K. (1974)

Chemical nature of synaptic transmission in vertebrates.

Physiol. Rev. 54 418-540

KRNJEVIC, K. (1981)

Desensitization of GABA receptors.

In E. COSTA et al (Eds) GABA and benzodiazepine receptors. Raven Press New York .pp 111-120

LABARCA, P.; SIMON, S.A. & ANHOLT, R.R.H. (1988)

Activation by odorants of a multistate cation channel from olfactory cilia.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 85 944-947

La MANTIA, A.S. & PURVES, D. (1989)

Development of glomerular pattern visualized in the olfactory bulbs of living mice.

Nature 341 646-649

- LANGERON, M. (1949)**
Précis de microscopie.
Masson et Cie (Eds) Paris. pp 580-581
- Le MAGNEN, J. (1968)**
Les mécanismes de l'odorat.
Atomes 254 280-286.
- LEON, M. (1987)**
Plasticity of olfactory output circuits related to early olfactory learning..
T.I.N.S. 10 434-438
- LEVETEAU, J. & MAC LEOD, P. (1966)**
La discrimination des odeurs par les glomérules olfactifs du lapin (étude électrophysiologique).
J. Physiol. (Paris) 58 717-729.
- LEVY, R.A. (1977)**
The role of GABA in primary afferent depolarization.
Prog. Neurobiol. 9 211-
- LEWIN, E. & HESS, H.H. (1964)**
Intralaminar distribution of Na, K-adenosine triphosphatase in rat cortex.
J. Neurochem. 11 473-481
- LEWIS, D.J. & SCHUETTE, W.K. (1975)**
NADH fluorescence and $[K^+]_o$ changes during hippocampal electric stimulation.
J. Neurophysiol. 38 405-417.
- LICHTSTEIN, D.; SAMUELOV, S. & BOURRIT, A. (1985)**
Characterization of the stimulation of neuronal Na, K-ATPase activity by low concentrations of ouabain.
Neurochem. Int. 7 709-715.
- LOEFFLER, J.P.; DESAULES, E. ; DEMENEIX, B.A. & FELTZ, P. (1982)**
Electrophysiological study with K- and Ca- sensitive micropipettes of GABA receptors in the rat neurointermediate lobe in vitro.
Neurosci. Lett. 34 271-276.

LONGENECKER, H.E.Jr & URSCHEL, R. (1976)

An "amplifier" for intracellular recording.
J. E.P.T. 5 3-6.

LOTHMAN, E.; LA MANNA, J.C.; CORDINGLEY, G.; ROSENTHAL, M. & SOMJEN, G. (1975)

Responses of electrical potential, potassium levels and oxydative metabolic activity of the cerebral neocortex of cats.
Brain Research 88 15-36.

LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L. & RANDALL, R.J. (1951)

Protein measurement with the folin phenol reagent.
J. Biol. Chem. 193 265-275.

LUX, H.D. (1974)

Fast recording ion specific microelectrodes : their use in pharmacological studies in the CNS.
Neuropharmacology 13 509-517.

Mac LEOD, N.K. & STRAUGHAN, D.W. (1979)

Responses of olfactory bulb neurones to the dipeptide carnosine.
Exp. Brain Res. 34 183-188.

MAIR, R.G.; GESTELAND, R.C. & BLANK, D.L. (1982a)

Changes in morphology and physiology of olfactory receptor cilia during development.
Neuroscience 7 3091-3103.

MAIR, R.G.; GELLMAN, R.L. & GESTELAND, R.C. (1982b)

Postnatal proliferation and maturation of olfactory bulb neurones in the rat.
Neuroscience 7 3105-3116.

MAJEWSKA, M.D. & CHUANG, D.M. (1984)

Modulation by calcium of gamma-aminobutyric acid (GABA) binding to GABA_A and GABA_B recognition sites in rat brain.
Mol. Pharmacol. 25 352-359.

MALENKA, R.C.; KOCSIS, J.D.; RANSOM, B.R. & WAXMAN, S.G. (1981)

Modulation of parallel fiber excitability by postsynaptically mediated changes in extracellular potassium.

Science 214 339-341

MALENKA, R.C. & KOCSIS, J.D. (1982)

Effects of GABA on stimulus-evoked changes in K_0 and parallel fiber excitability.

J. Neurophysiol. 48 608-621.

MARTINEZ, D.P. & FREEMAN, W.J. (1984)

Periglomerular cell action on mitral cells in olfactory bulb shown by current density analysis.

Brain Research 308 223-233.

MATH, F. & DAVRAINVILLE, J.L. (1980)

Electrophysiological study on the postnatal development of mitral cell activity in the rat olfactory bulb.

Brain Research 190 243-247.

MATH, F. (1984)

Etude du développement électrophysiologique des bulbes olfactifs chez le rat. Influence de facteurs modifiant l'ontogenèse.

Thèse d'état. Université de NANCY-I.

MATH, F; KHAYARI, A. & DAVRAINVILLE, J.L. (1988b)

Influence of GABA, baclofen and bicuculline on the extracellular K activity in the olfactory bulb of the developing rat.

Brain Res. 461 384-387

MATSUMOTO, M; SASAKI, K.; SHOZUSHIMA, M. & SATO, M. (1986)

Desensitization of Cl^- -dependent GABA response observed in ganglion cells of Aplysia.

Japan. J. Physiol. 36 349-358.

MAUE, R.A. & DIONNE, V.E. (1987)

Patch-clamp studies of isolated mouse olfactory receptor neurons.

J. Gen. Physiol. 90 95-125

- MAYEVSKY, A.; ZEUTEN, T. & CHANCE, B. (1974)**
Measurements of extracellular potassium, ECoG and pyridine nucleotide levels during cortical spreading depression in rats.
Brain Research 76 347-349.
- Mc LENNAN, H. (1971)**
The pharmacology of inhibition of mitral cells in the olfactory bulb.
Brain Research 29 177-184.
- MEISAMI, E. & MANOOCHEHRI, S. (1977)**
Effects of early bilateral chemical destruction of olfactory receptors on postnatal growth, Mg-ATPase and Na,K-ATPase activity of olfactory and non-olfactory structures of the rat brain.
Brain Res. 128 170-175
- MEISAMI, E. & SAFARI, L. (1981)**
A quantitative study of the effects of early unilateral olfactory deprivation on the number and distribution of mitral and tufted cells and of glomeruli in the rat olfactory bulb.
Brain Res. 221 81-107
- MORI, K; & KISHI, K. (1982)**
The morphology and physiology of the granule cells in the rabbit olfactory bulb revealed by intracellular recording and HRP injection.
Brain Res. 247 129-133
- MORI, K; & TAKAGI; S.F. (1978)**
An intracellular study of dendrodendritic inhibitory synapses on mitral cells in the rabbit olfactory bulb.
J. Physiol. (Lond.) 279 569-588
- MORI, K.; NOWYCKY, M.C. & SHEPHERD, G.M. (1981)**
Analysis of a long duration inhibitory potential in mitral cells in the isolated turtle olfactory bulb.
J. Physiol.(Lond.) 314 311-320.
- MORI, K.; NOWYCKY, M.C. & SHEPHERD, G.M. (1982)**
Impulse activity in presynaptic dendrites : analysis of mitral cells in the isolated turtle olfactory bulb.
J. Neurosci. 2 497-502.

- MORI, K.; NOWYCKY, M.C. & SHEPHERD, G.M. (1984)**
Synaptic excitatory and inhibitory interactions at distal sites on mitral cells in the isolated turtle olfactory bulb.
J. Neurosci. 4 2291-2296.
- MORI, K. (1987)**
Membrane and synaptic properties of identified neurons in the olfactory bulb.
Progress in Neurobiology 29 275-320.
- MOULTON, D.G. (1976)**
Spatial patterning of response to odours in the peripheral olfactory system.
Physiol. Rev. 56 578-593
- MOULTON, D.G. & BEIDLER, L.M. (1967)**
Structure and function in the peripheral olfactory system.
Physiol. Rev. 47 1-52
- MUGNAINI, E.; WOUTERLOOD, F.G.; DAHL, A.L. & OERTEL, W.H. (1984)**
Immunocytochemical identification of GABAergic neurons in the main olfactory bulb of the rat.
Archives Italiennes de Biologie 122 83-113.
- MUNOZ, J.L.; DEYHIMI, F. & COLES, J.A. (1983)**
Silanization of glass in the making of ion-sensitive microelectrodes.
J. Neurosci. Meth. 8 231-247
- NADI, N.S.; HIRSCH, J.D. & MARGOLIS, F.L. (1980)**
Laminar distribution of putative neurotransmitter, amino acids and ligand binding in the dog olfactory bulb.
J. Neurochem. 34 138-146.
- NAKAMURA, T. & GOLD, G.H. (1987)**
A cyclic nucleotide-gated conductance in olfactory receptor cilia.
Nature 325 442-444
- NEWBERRY, N.R. & NICOLL, R.A. (1984)**
Direct hyperpolarizing action of baclofen on hippocampal pyramidal cells.
Nature 308 450-452.

NICHOLSON, C.; PHILLIPS, J.M. & GARDNER-MEDWIN, A.R. (1979)

Diffusion from an iontophoretic point source in the brain : role of tortuosity and volume fraction.

Brain Research 169 580-548.

NOWYCKY, M.C.; MORI, K. & SHEPHERD, G.M. (1981)

GABAergic mechanisms of dendrodendritic synapses in the isolated turtle olfactory bulb.

J. Neurophysiol. 46 639-648

OKANO, M. & TAKAGI, S.F. (1974)

Secretion and electrogenesis of the supporting cell in the olfactory epithelium.

J. Physiol. (Lond.) 242 353-370.

ORKAND, R.K.; NICHOLLS, J.G. & KUFFLER, S.W. (1966)

Effect of nerve impulses on the membrane potential of glial cells in the central nervous system of amphibia.

J. Neurophysiol. 29 788-806.

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. 266 346-356

OTTOSON, D. (1956)

Analysis of the electrical activity of the olfactory epithelium.

Acta. Physiol. Scand. 35 (S122) 1-83.

PACE, U.; HANSKI, E.; SALOMON, Y & LANCET, D. (1985)

Odorant-sensitive adenylate cyclase may mediate olfactory reception.

Nature 316 255-258

PINCHING, A.J. (1970)

Synaptic connexions in the glomerular layer of the olfactory bulb.

J. Physiol. (Lond.) 210 14-15

PINCHING, A.J. & POWELL, T.P.S. (1971a)

The neuron types of the glomerular layer of the olfactory bulb.

J. Cell. Sci. 9 305-345

- PINCHING, A.J. & POWELL, T.P.S. (1971b)**
The neuropil of the glomeruli of the olfactory bulb.
J. Cell. Sci. 9 347- 377
- PRICE, J.L. & POWELL, T.P.S. (1970a)**
The mitral and short axon cells of the olfactory bulb.
J. Cell. Sci. 7 631-651
- PRICE, J.L. & POWELL, T.P.S. (1970b)**
An electron microscopic study of the termination of the afferent fibres to the olfactory bulb from the cerebral hemisphere.
J. Cell. Sci. 7 157-187.
- POTAPOV, A.A. (1985)**
Baclofen inhibition of synaptic transmission in frog olfactory bulb glomeruli.
Neurofisiologia 17 834-837.
- PUMAIN, R. & HEINEMANN, U. (1985)**
Stimulus-evoked and aminoacid-induced calcium and potassium changes in rat neocortex.
J. Neurophysiol. 53 1-16
- 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
- RALL, W. & SHEPHERD, G.M. (1968)**
Theoretical reconstruction of field potentials and dendrodendritic synaptic interactions in olfactory bulb.
J. Neurophysiol. 31 884-915
- READER, T.A. (1980)**
Microiontophoresis of biogenic amines on cortical neurons: amounts of NA, DA and 5-HT ejected, compared with tissue content.
Acta Physiol. Scandinavica 30 291-304
- REESE, T.S. (1965)**
Olfactory cilia in the frog.
J. Cell. Biol. 25 209-230.

REESE, T.S. & SHEPHERD, G.M. (1972)

Dendro-dendritic synapses in the central nervous system.
in PAPPAS, G.D. & PURPURA, D.P. (Eds); Structure and function of synapses. Raven, NEW YORK; pp 121-136.

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

ROBERTSON, B. & TAYLOR, W.R. (1986)

Effects of gamma-aminobutyric acid and (-)baclofen on calcium and potassium currents in cat dorsal root ganglion neurons in vitro.
Br; J. Pharmac. 89 661-672.

SCHLICHTER, R.; DEMENEIX, B.A.; DESARMENIEN, M.; DESAULES, E.; LOEFFLER, J.P. & FELTZ, P. (1984)

Properties of the GABA receptors located on spinal primary afferent neurones and hypophyseal neuroendocrine cells of the rat.
Neurosci. Lett. 47 257-263

SCHOENFELD, T.A. & MACRIDES, F. (1984)

Topographic organization of connexions between the main olfactory bulb and pars externa of the anterior olfactory nucleus in the hamster.
J. Comp. Neurol. 227 121-135

SEGAL, M. & GUTNICK, M.J. (1980)

Effects of serotonin on extracellular potassium concentration in the rat hippocampal slice.
Brain Research 195 389-401.

SHEPHERD, G.M. (1972)

Synaptic organization of the mammalian olfactory bulb.
Physiol. Rev. 52 864-917.

SHEPHERD, G.M. (1978)

Les microcircuits du systeme nerveux.
Pour La Science 6 42-51

SHEPHERD, G.M.; GETCHELL, T.V. & MISTRETTA, C.M. (1986)

Questions of taste and smell.
Nature 324 17-18

SHIPLEY, M.T.; HALLORAN, F.J. & DE LA TORRE, J. (1985)

Surprisingly rich projection from locus caeruleus to the olfactory bulb in the rat.

Brain Research 329 294-299.

SIMON, W.; AMMANN, D.; OEHME, M; & MORF, W.E. (1978)

Calcium-selective electrodes.

Ann. N. Y. Acad. Sci. 307 52-70

SOMJEN, G.; DINGLEDINE, B.; CONNORS, B. & ALLEN, B. (1981)

Extracellular potassium and calcium activities in the mammalian spinal cord, and the effect of changing ion levels on mammalian neural tissues.

in SYKOVA, E.; HINK, P. & VYKLICKY, L. (Eds), Ion-selective microelectrodes and their use in excitable tissues. Plenum, NEW YORK; pp 159-180.

STAHL, W.L. & BRODERSON, S.H. (1976)

Histochemical localization of potassium-stimulated p-nitrophenyl-phosphatase activity in the somatosensory cortex of the rat.

J. Histochem. Cytochem. 24 731-739.

STEINBUSCH, H.W.M.; VERHOFSTAD, A.A.J. & JOOSTEN, H.W.J. (1978)

Localization of serotonin in the central nervous system by immunohistochemistry : description of a specific and sensitive technique and some applications.

Neuroscience 3 811-819.

STEINBUSCH, H.W.M. (1981)

Distribution of serotonin-immunoreactivity in the central nervous system of the rat cell bodies and terminals.

Neuroscience 6 557-618.

STEWART, W.B.; KAUER, J.S. & SHEPHERD, G.M. (1979)

Functional organization of rat olfactory bulb analyzed by the 2-deoxyglucose method.

J. Comp. Neurol. 185 715-734

SUZUKI, N. (1978)

Effects of different ionic environments on the responses of single olfactory receptors in the lamprey.

Comp. Biochem. Physiol. 61 461-467

SYKOVA, E. & ORKAND, R.K. (1980)

Extracellular potassium accumulation and transmission in frog spinal cord.

Neuroscience 5 1421-1428.

SYKOVA, E. (1981)

Extracellular K⁺ accumulation in the spinal cord.

in SYKOVA, E.; HINK, P. & VYKLICKY, L. (Eds), Ion-selective microelectrodes and their use in excitable tissues. Plenum, NEW YORK; pp 139-158.

SYKOVA, E. (1983)

Extracellular K⁺ accumulation in the central nervous system.

Prog. Biophys. Molec. Biol. 42 135-189.

TAKAGI, S.F.; WYSE, G.A.; KITAMURA, H. & ITO, K; (1968)

The roles of sodium and potassium ions in the generation of the electroolfactogram.

J. Gen. Physiol. 51 552- 578

TONOSAKI, K. & SHIBUYA, T. (1979)

Action of some drugs on gecko olfactory bulb mitral cell responses to odor stimulation.

Brain Research 167 180-184.

THOMAS, R.C. (1978)

Ion-sensitive intracellular microelectrodes. How to make and use them.

Academis Press (Lond.)

TRACHTENBERG, M.C. & POLLEN, D.A. (1969)

Neuroglia : biophysical properties and physiological function.

Science 167 1248-1252.

TROTIER, D. (1986)

A patch-clamp analysis of membrane currents in salamander olfactory receptor cells.

Pflügers Arch. 407 589-595

TROTIER, D. & MAC LEOD, D. (1983)

Intracellular recordings from salamander olfactory receptor cells.

Brain Res. 268 225-237

TROTIER, D. & MAC LEOD, P. (1986)

Intracellular recordings from salamander olfactory supporting cells.

Brain Research 374 205-211.

von BAUMGARTEN, R. ; GREEN, J.D. & MANCIA, M. (1962)

Reccurent inhibition in the olfactory bulb. II- Effects of antidromic stimulation of commissural fibers.

J. Neurophysiol. 25 489-500.

VORONKOV, G.S. & GUSEL'NIKOVA, K.G. (1967)

Inhibition in glomeruli of the olfactory bulb.

Neuroscience (translation) 4 425-426.

VYSKOCIL, F. KRIZ, N. & BURES, J. (1972)

Potassium-selective microelectrodes used for measuring the extracellular brain potassium during spreading depression and anoxic depolarization in rats.

Brain Research 39 255-259.

WALKER, J.L.Jr (1971)

Ion specific liquid ion exchanger microelectrodes.

Anal. Chem. 43 89A-93A.

WALKER, J.L. (1981)

Intracellular potassium and chloride measurements in sheep cardiac Purkinje fibers.

in SYKOVA, E.; HINK, P. & VYKLYCKY, L. (Eds), Ion-selective microelectrodes and their use in excitable tissues. Plenum, NEW YORK; pp 55-66

WALKER, J.L. & BROWN, H.M. (1977)

Intracellular ionic activity measurements in nerve and muscle.

Physiol. Rev. 57 729-778.

WHITE, E.L. (1972)

Synaptic organization in the olfactory glomerulus of the mouse.
Brain Research 37 69-80.

YAMAMOTO, C.; YAMAMOTO, T. & IWAMA, K. (1963)

The inhibitory systems in the olfactory bulb studied by intracellular recordings.

J. Neurophysiol. 26 403-415.

YOSHI, K. & KURIHARA, K. (1983)

Role of cations in olfactory reception.

Brain Res. 274 239-248

ANNEXES

TRAVAUX ORIGINAUX PUBLIES

KHAYARI, A.; MATH, F; & DAVRAINVILLE, J.L. (1988a)

Electrical stimulation of primary olfactory nerve induces two types of variations in the extracellular potassium activity within the glomerulus of the rat olfactory bulb in vivo.

Brain Res. 457 188-191

KHAYARI, A.; MATH, F; & DAVRAINVILLE, J.L. (1988c)

Evidence for an absence of K spread in the glomerular layer of the rat olfactory bulb.

Neurosci. Lett. 93 56-60

KHAYARI, A.; MESFIOUI, A.; MATH, F; & DAVRAINVILLE, J.L. (1990)

Na,K-ATPase in the rat olfactory bulb : evidence for a higher enzymatic activity in the glomerular layer.

Brain Res. 510 140-143

MATH, F; KHAYARI, A. & DAVRAINVILLE, J.L. (1988b)

Influence of GABA, baclofen and bicuculline on the extracellular K activity in the olfactory bulb of the developing rat.

Brain Res. 461 384-387

Electrical stimulation of primary olfactory nerve induces two types of variations in the extracellular potassium activity within the glomerulus of the rat olfactory bulb in vivo

A. Khayari, F. Math and J.L. Davrainville

Laboratoire de Physiologie Générale II, Université de Nancy I, Vandoeuvre les Nancy (France)

(Accepted 19 April 1988)

Key words: Olfactory bulb; Potassium; Ion-sensitive microelectrode

Primary olfactory nerve stimulation induces a two-step increase in extracellular potassium, as recorded by K^+ -sensitive microelectrodes inserted into single glomeruli of the rat olfactory bulb. The second rise in K^+ (K-peak) occurs in a graded, activity-dependent manner at the basal pole of the glomerular neuropile. This phenomenon appears to be directly related to the rate of extracellular K^+ accumulation and is accompanied by a substantial depression of the mitral cell firing rate.

It has been shown that electrical stimulation of the primary olfactory nerve (PON) resulted in a long-lasting alteration in the glomerular function^{3,4,6} which was sensitive to the stimulus rate³. The antidromical stimulation of the lateral olfactory tract failed to induce such an alteration³. This suggests that this process is localized in the glomerular layer. Furthermore, attenuation seems to be a side effect rather than a direct effect of synaptic transmission³. The magnitude of the stimulation-induced increase in the extracellular potassium (a_K) as recorded with K^+ -sensitive microelectrodes (KSM), was highest in very localized areas of the glomerular layer, precisely within single glomeruli and coincided with the peak of PON depolarization⁴.

The glomerular geometry, exhibiting tight packing of neuronal networks in glial sheaths⁹ might account for prolongation of the action of released K^+ or that of any other non-specific substance and for prevention of its diffusion to deeper layers³. K^+ and/or neurotransmitter released at the glomerular synapses thus might diffuse through the extracellular clefts and depolarize PON axon terminals producing a reduction in transmitter release^{1,8}.

This study was undertaken to examine the activity-dependent increase in extracellular potassium and to seek further information on the effects of K^+ accumulation on glomerular transmission.

Thirty to 45-day-old Wistar rats were anesthetized with equithesine (0.5 ml/100 g b. wt.) and immobilized with gallamine triethiodide (0.5 ml/100 g). The surgical procedure included tracheal intubation and head dorsal skin removal and trepanning of bone over both olfactory bulbs. The rats were artificially ventilated and placed in a stereotaxic head holder. KSMs were made according to Lux's⁵ method by filling the tip of siliconized pipettes (2 μ m in diameter) with K^+ -ion exchanger resin (Corning 477317). The shank was filled with 0.1 M KCl solution. KSMs were then coupled to 165 mM NaCl-containing reference electrodes and calibrated (slope: 52 mV/10-fold change in a_K). A 3-barrel pipette glued to the KSM was used for iontophoretic applications of KCl and $CoCl_2$ (0.1 M, Merck). The distance tip-to-tip was about 6 μ m. Stimulations were delivered via a Tungsten electrode (20–30 μ m in diameter) positioned 1 mm anterior to the KSM. Stimulation parameters were 4–6 V, 1 ms and 10–50 Hz. Higher stimulus fre-

Correspondence: F. Math, Laboratoire de Physiologie Générale II, Université de Nancy I, B.P. 239, 54506 - Vandoeuvre les Nancy, Cedex, France.

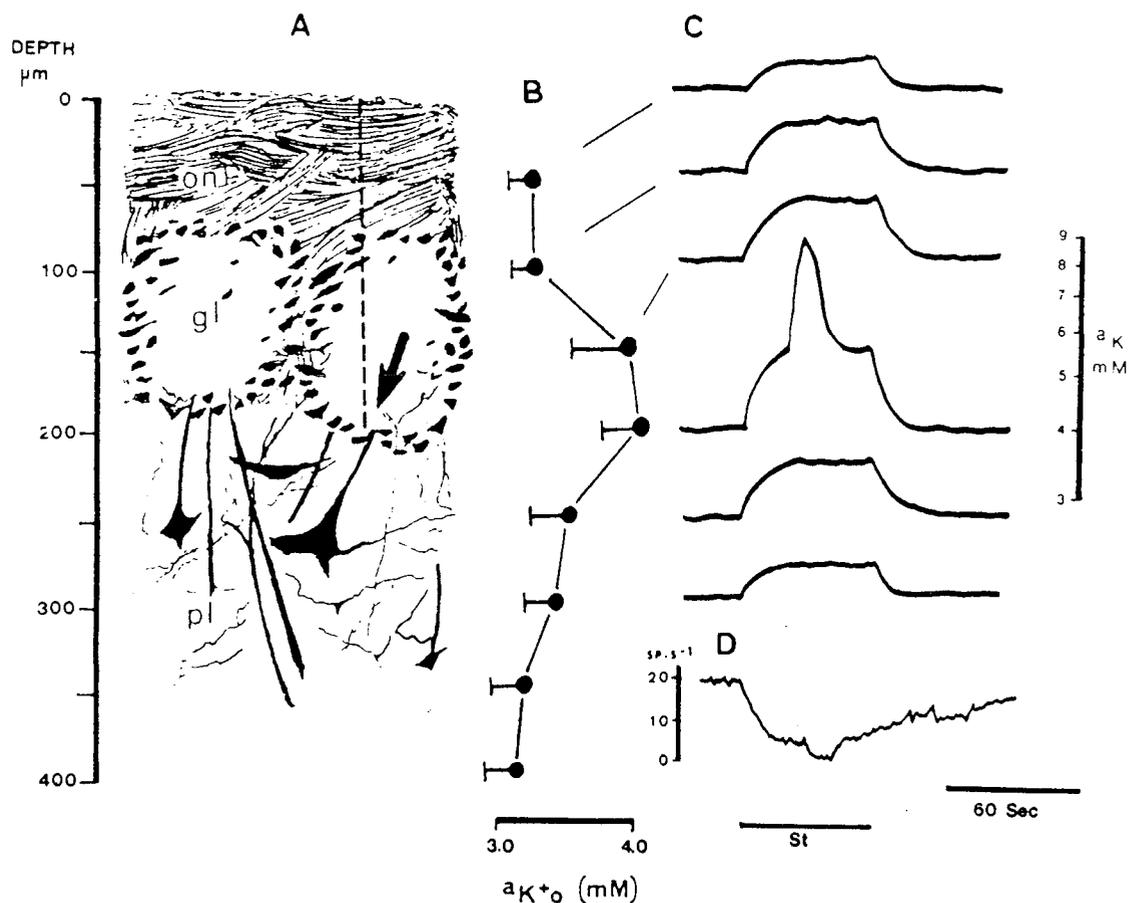


Fig. 1. Changes in a_K in response to primary olfactory nerve (PON) stimulation recorded in the various olfactory bulb layers. A: camera lucida drawing of a Nauta-Gigax stained slice showing the position of the K-sensitive electrode tip (arrow) when the K-peak was recorded. B: resting a_K values ($a_K \pm S.D.$, $n = 33$) monitored at different depths. C: responses produced by supramaximal (6 V, 50 Hz) stimulation of PON. A two-step rise of a_K is obtained when the K-sensitive electrode is placed in the glomerular basal pole. D: an integrated mitral cell firing pattern is shown. Onl, olfactory nerve layer; gl, glomerular layer; pl, plexiform layer.

quencies were shown to correspond to greater activity¹.

Histological controls using a modified Nauta-Gigax silver impregnation method² were performed at the end of experiments in order to determine the exact position of the KSM tip.

As the KSM was moved into the various bulbar laminae, the measured resting a_K value peaked in the glomerular layer: 4.01 ± 0.5 mM vs 3.30 ± 0.2 mM in the other layers (Fig. 1B).

A typical experiment of stimulation-induced increase in a_K is shown in Fig. 1C. It can be seen that the response is greatest in the glomerular layer (1.5–2 mM) and decreases in other layers. Furthermore, in very localized areas, at precisely the basal pole of the glomerular neuropil (Fig. 1A, arrow) as

revealed by histological controls (at 200 ± 30 μm, mean \pm S.D. for $n = 27$), a second but large and fast-rising K-peak was induced by supramaximal PON stimulation. This peak represented a 3.00 ± 1.05 mM ($n = 33$) change in a_K , it occurred after a 21.6 ± 5.8 s delay and lasted for 21.9 ± 5.5 s. According to our first assays with two KSMs separated by about 200 μm, this peak did not seem to be propagated from the glomerulus where it occurred to adjacent ones. Increasing the stimulus rate increased the peak's amplitude and reduced its delay phase (Fig. 2A).

Mitral cell discharge recording showed that the firing rate was strongly depressed during the K-peak (Fig. 1D) and a total interruption of discharges was often observed.

The influence of cations on the stimulation-in-

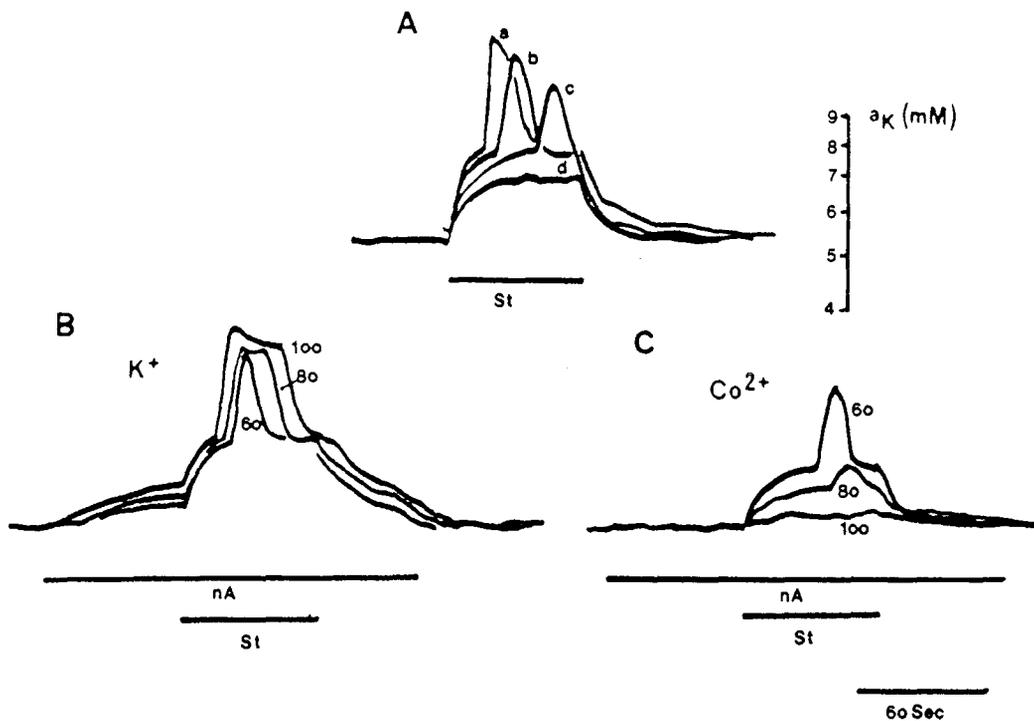


Fig. 2. Influence of stimulus rate and cation application on the rise of a_K . Increasing the stimulus rate enhanced the two-step increase in a_K (A); submaximal primary olfactory nerve stimulation (d) failed to induce the K-peak, while supramaximal stimuli (a-c) reduced the delay and increased the amplitude (a: 8 V, 50 Hz; b: 6 V, 50 Hz; c: 6 V, 30 Hz; d: 4 V, 50 Hz or 6 V, 10 Hz). B: K^+ application shortened the latency time and increased the duration and amplitude of the K-peak. Cobalt iontophoresis (C) produced dose-dependent reduction of the amplitude of the two-step rise of a_K and, for high ejection currents (100 nA), the disappearance of all the variations of a_K .

duced K-peak was also studied. K^+ iontophoresis enhanced the K-peak (Fig. 2B). A 100 nA pulse thus increased the response's amplitude (3.95 ± 1.35 mM, $P < 0.005$ for $n = 33$) and duration (31.72 ± 5.91 s, $P < 0.001$) but it shortened the delay (13.6 ± 3.64 s, $P < 0.001$).

In order to affect glomerular transmission, we have used cobalt ion applications. Low ejection currents, up to 60–80 nA, depressed the K-peak in a dose-dependent manner (Fig. 2C) and higher currents totally suppressed the occurrence of the phenomenon.

We have demonstrated that PON stimulation induces an increase in a_K which is greatest in the glomerular layer. This might be related to the occurrence, at this level, of numerous afferent terminals¹⁰ as was observed in the spinal cord¹¹. At the basal pole of single glomeruli, the KSM recorded a two-step variation in a_K . The appearance of the K-peak is directly related to the stimulation-evoked activity. This is confirmed by the fact that submaximal stimuli failed to

induce it, and that increased stimuli rate increased its amplitude and shortened its delay phase. This, along with the blockade of synaptic transmission with cobalt suggests that activation of postsynaptic elements is necessary for the production of the K-peak.

The delay phase being reduced during supramaximal stimulation or during potassium iontophoresis, leads us to conclude that the K-peak is directly related to the rate of extracellular K^+ accumulation. On the other hand, the two-step increase in a_K coincided with a substantial depression of the relay neuron discharges suggesting that the alteration of extracellular K^+ occurring during synaptic interactions may account for glomerular transmission attenuation³. Our results demonstrate that K^+ accumulation may be involved in a long-term neuromodulatory control of the glomerular output. The potentials generated at the distal portion of the mitral cell primary dendrite⁷ spread electrotonically along the synapse-free dendritic trunk³. They represent the integrated outcome of complex synaptic interactions⁷

and of side-effects of the synaptic transmission³ occurring by the potassium ion accumulation⁸.

This work was supported by a Grant from the Med-

ical Research Foundation. We are grateful to Professor A. Holley for his criticisms in the course of this work. We also thank Mrs C. Math for her technical assistance.

- 1 Eng, D.L. and Kocsis, L.D., Activity-dependent changes in extracellular potassium and excitability in Turtle olfactory nerve. *J. Neurophysiol.*, 57 (1987) 740–754.
- 2 Fink, R.P. and Heimer, L., Two methods for selective silver impregnation of degenerating axons and their synaptic endings in the central nervous system. *Brain Research*, 4 (1967) 369–374.
- 3 Freeman, W.J., Relation of glomerular neuronal activity to glomerular transmission attenuation. *Brain Research*, 65 (1974) 91–107.
- 4 Jahr, C.E. and Nicoll, R.A., Primary afferent depolarisation in the in vitro frog olfactory bulb. *J. Physiol. (Lond.)*, 318 (1981) 375–384.
- 5 Lux, H.D., Fast recording ion specific microelectrodes: their use in pharmacological studies in the CNS. *Neuropharmacology*, 13 (1974) 509–517.
- 6 Martinez, D.P. and Freeman, W.J., Periglomerular cell action on mitral cells in the olfactory bulb shown by current source density analysis. *Brain Research*, 308 (1984) 223–233.
- 7 Mori, K., Membrane and synaptic properties of identified neurons in the olfactory bulb. *Prog. Neurobiol.*, 29 (1987) 275–320.
- 8 Mori, K., Nowycky, M.C. and Shepherd, G.M., Synaptic excitatory and inhibitory interactions at distal dendritic sites on mitral cells in the isolated turtle olfactory bulb. *J. Neurosci.*, 4 (1984) 2291–2296.
- 9 Pinching, A.J. and Powell, T.P.S., The neuron types of the glomerular layer of the olfactory bulb. *J. Cell Sci.*, 9 (1971) 305–345.
- 10 Shepherd, G.M., Synaptic organisation of the mammalian olfactory bulb. *Physiol. Rev.*, 52 (1972) 864–917.
- 11 Sykova, E., Extracellular K accumulation in the spinal cord. In E. Sykova, P. Hink and L. Vyklicky (Eds.), *Ion-Selective Microelectrodes and Their Use in Excitable Tissues*, Plenum, New York, 1981. pp. 139–158.

NSL 05613

Evidence for an absence of K^+ spread in the glomerular layer of the rat olfactory bulb

A. Khayari, F. Math and J.-L. Davrainville

Laboratoire de Physiologie Générale II, Université de Nancy-I, (France)

(Received 4 April 1988; Revised version received 13 June 1988; Accepted 16 June 1988)

Key words: Potassium ion; Ion-selective microelectrode; Olfactory bulb; Rat

Using K^+ -sensitive microelectrodes inserted into the olfactory bulb, the effects of distant K^+ ejection on the extracellular K^+ activity (a_K), were monitored in the glomerular and plexiform layers. A ouabain-sensitive mechanism, which appeared to be markedly more efficient in the glomerular layer, prevents spread of distal ejected K^+ . The results are discussed on the basis of Na^+, K^+ -pump activation in both glomerular neuronal networks and the glial capsule enclosing each glomerulus.

The olfactory nerve projects onto the olfactory bulb in discrete structures, the olfactory glomeruli. Each glomerulus contains a dense accumulation of afferent axon terminals [3] and is partially encapsulated in glial sheaths [10] which might prevent depolarizing substances from diffusing laterally and into the deeper layers [2]. Numerous arguments are accumulating which suggest that an attenuation process occurs at the glomerular level as a side-effect of synaptic transmission [6]. Non-specific substances, especially potassium ions, are supposed to play a key role in this process [2, 5, 8].

The aim of the present work is to investigate the spread of iontophoresed K^+ by means of measurement of extracellular K^+ activity changes in surrounding areas.

Thirty-to-45-day-old male Wistar rats were anaesthetised with equitiesin (0.3 ml/100 g b.wt.) and immobilized with gallamine triethiodine (10 mg/100 g b.wt.). The surgical procedure included tracheal intubation, head dorsal skin removal and trepanning of bone over both olfactory bulbs. Rats were artificially ventilated and placed in a stereotaxic head holder.

Potassium-selective microelectrodes (KSM) were made according to Lux's [6] method by filling the tip of siliconised pipettes (2 μ m in diameter), with K-ion exchanger resin (Corning, 477317, WPI). The shank was filled with 0.1 M KCl solution. They were coupled to a 165 mM NaCl-containing reference electrode. They

Correspondence: F. Math, Laboratoire de Physiologie Générale II, Université de Nancy-I, Bd. des Aiguillettes B.P. 239, 54506 Vandoeuvre-les-Nancy Cedex, France.

0304-3940/88/\$ 03.50 © 1988 Elsevier Scientific Publishers Ireland Ltd.

were then calibrated (slope: 52 mV/10-fold change in a_K). Two 3-barreled iontophoresis micropipettes were glued to the KSM; they contained: KCl 1.0 M, ouabain 10 mM in NaCl 165 mM and NaCl 165 mM solutions. One of the iontophoresis pipettes was 6–10 μm away from the KSM tip (local ejections) and the other was about 100 μm distant from it (distal ejections). The latter distance corresponds to the mean diameter of a glomerulus [12]. A high-impedance DC amplifier was used to perform the a_K measurements and a iontophoresis generator (WPI institute) was used to apply ejection currents. Mean a_K values were compared using the non-parametric Mann-Whitney U -test.

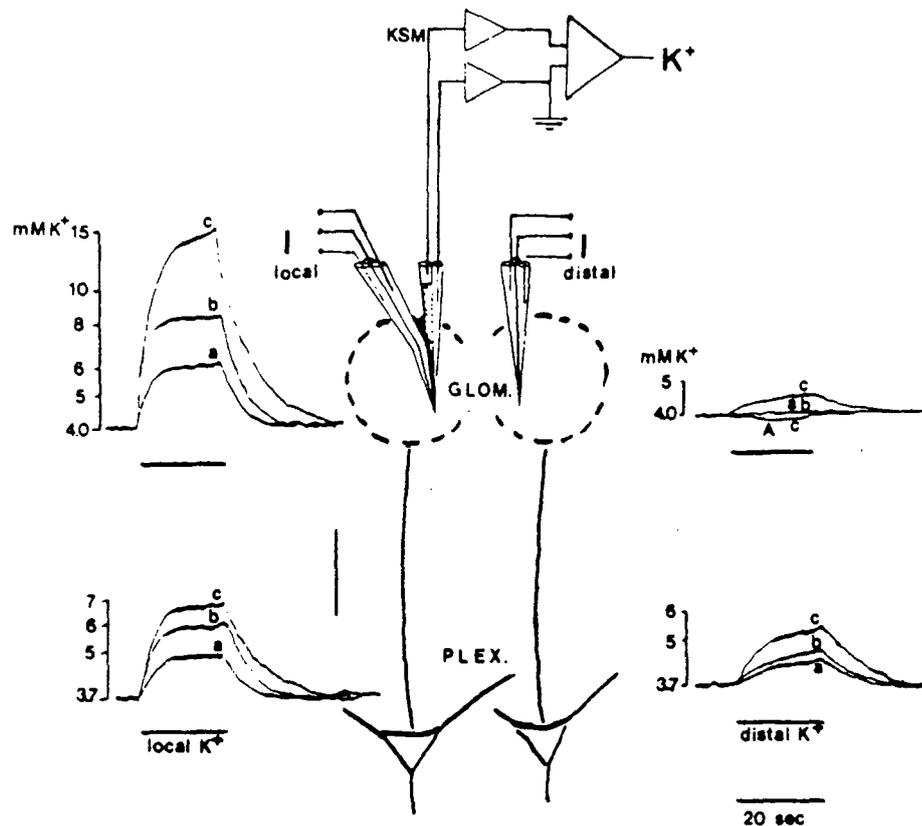


Fig. 1. Comparison of extracellular variations in a_K in response to iontophoretically applied KCl from local and distal sources, and in two bulbar layers: glomerular layer (GLOM.) and plexiform layer (PLEX.). The a_K variations were recorded at the local ejection site. A 100 nA local K^+ , triggered a control a_K increase which peaked in the glomerular layer. Distal K^+ (100 nA) evoked a negligible change in a_K in the glomerular layer and a more significant one in the plexiform layer. At the glomerular level distal ejection currents of 800 nA depressed in some tests ($n=6$), the a_K about 5 s after the beginning of the pulse (arrowhead). The middle inset shows the position of the electrodes as revealed histologically (silver impregnation) while they were located in the glomerular layer. Note the time to peak and decay rate of control pulse which are the lowest in the glomerular layer. Vertical bar: 100 μm ; I local, I distal: iontophoresis sources; a, b, and c represent 60, 100 and 800 nA KCl ejection currents, respectively.

A 4.0 ± 0.2 mM (mean \pm S.D. on $n=12$) resting a_K value was measured in the extracellular space as the K^+ -sensitive microelectrode (KSM) was lowered into the glomerular layer (Glom). This value decreased to 3.7 ± 0.2 mM (significant at $P < 0.01$) in the plexiform layer (Plex.). At the glomerular level, a 100 nA local iontophoretic pulse of KCl for 20 s (see Fig. 1) induced a fast-rising 4.2 ± 0.7 mM change in a_K . The same current applied to the distal pipette (Fig. 1) induced a very slight change in a_K (0.06 ± 0.04 mM). Currents above 800 nA applied to the distal pipette induced a 0.59 ± 0.22 mM change in a_K but in half experiments ($n=6$) a slight decrease in a_K (0.1 ± 0.05 mM) was observed in the Glom. layer about 5 s after the beginning of the pulse (see c, arrowhead in Fig. 1).

When the micropipette tips were below $250 \mu\text{m}$ (below the upper limit of the plexiform layer) (potassium iontophoresis from either micropipettes (100 nA currents) induced a a_K variation whose values were 2.63 ± 0.64 and 0.55 ± 0.16 mM for local and distal K^+ ejection respectively. In the Plex. the a_K triggered by local K^+ represented only 48% ($p < 0.01$) of the change evoked by local K^+ in the glomerular layer.

Ouabain applied iontophoretically (100 nA distal or local pulse) increased the a_K variation in response to either local or distal K^+ application (Fig. 2).

In the glomerular layer, local ouabain preceding KCl ejection made the a_K change to increase (9.1 ± 0.8 mM vs 4.2 ± 0.7 mM for local K^+ alone) whereas distal ouabain enhanced K^+ diffusion from the distal ejection site (5.65 ± 1.3 mM vs 0.06 ± 0.04 mM

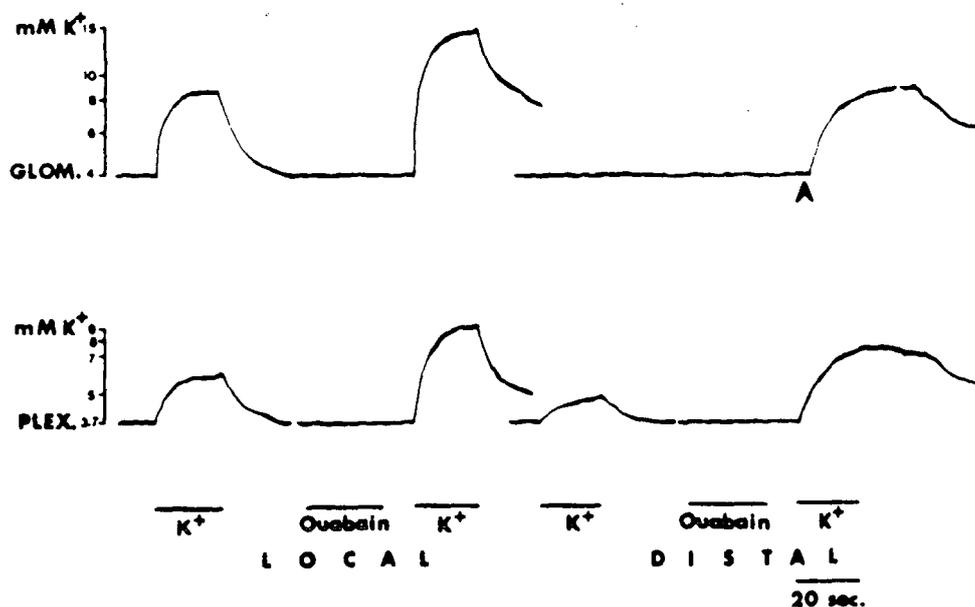


Fig. 2. Influence of ouabain on potassium diffusion. Iontophoretically applied ouabain (100 nA), in the glomerular or plexiform layers did not affect the resting a_K value but it strongly amplified the local K^+ -evoked change in a_K , and enhanced, after a 5 s delay (arrow), the diffusion of distal K^+ applied in the glomerular layer. No delay was observed in the plexiform layer. Note the prolonged time to decay after ouabain ejection. Abbreviations, same as in Fig. 1.

for distal K^+ alone). In the plexiform layer the responses were 6.3 ± 0.4 and 4.3 ± 0.6 mM for local and distal ouabain + KCl, respectively. It was also noted that in the glomerular layer, the ouabain-associated diffusion of K^+ from the distal ejection site was apparent nearly 5 s after the beginning of K^+ ejection and that ouabain delayed the a_K resting level recovery for up to 2 min.

The resting a_K value measured in the extracellular space as the KSM penetrated into the different olfactory bulb layers, is the combined result of K^+ release in the extracellular space, its distribution within this volume and its re-uptake by transport processes [15].

The evoked a_K rise may affect primary afferent depolarisation and/or transmitter release [15] which may in turn modulate extracellular K^+ . Since these phenomena could be present at both local and distal sites, they were not taken into account in the present investigation.

The tortuosity and volume fraction of the extracellular space were taken into account to explain the K^+ diffusion properties into the brain. These two factors were introduced by Nicholson et al. [9] in Curtis et al.'s [1] diffusion equation. Our calculations using this revised equation showed agreement between the theoretical amount of K^+ diffusing from a point to another (about 100μ distant) and the KSM-recorded change in a_K , in the plexiform layer. In the glomerular layer such a relationship was not found.

Since glomeruli are partially glia-encapsulated spherules of bulbar neuropil [5, 11], the glial sheath would serve to contain potassium ions and prevent their diffusion to deeper layers and to surrounding glomeruli [2]. Thus, the tight packing of pre- and postsynaptic glomerular investments in glial lamellae, could not only buffer these terminals from K^+ released during activation [10, 16] but also limit K^+ spread to and from other glomeruli. The mechanism of normal extracellular K^+ level recovery may involve passive K^+ diffusion in the extracellular space, dispersion across the blood-brain barrier and passive or active dissipation via glial cells [10, 14, 16].

In addition to the so-called glial 'buffering system' [10], another major mechanism is the activation of the Na^+, K^+ -pump, which is the main transmembrane transport mechanism for the clearance of the accumulated extracellular K^+ [15]. The glial cells and the neuronal elements share the ability to pump K^+ by a mechanism involving Na^+, K^+ -ATPase activation. The glial ATPase might be more active and more sensitive to raised extracellular a_K . In the present case it is likely that it is mainly the neuronal components and not the glia, which are responsible for the active re-absorption of K^+ , since glomeruli exhibit a great density of neuronal processes, especially primary afferent terminals [3]. Furthermore, there is a lack of evidence that the glia enclosing glomeruli is specialised.

The 100 nA applied ouabain (a selective inhibitor of Na^+, K^+ -activated ATPase) within the glomerulus enhanced extracellular diffusion of both local and distal iontophoretically applied K^+ ; it also slowed the rate of a_K recovery. The 5 s delay observed in the glomerular layer in response to either 800 nA K^+ or distal ouabain + K^+ , suggests that some other mechanism (passive or ouabain-insensitive active K^+ transport), might clear up the first ejected particles, before the mechanism is broken down by the continuous flow of K^+ out of the iontophoresis pipette. The delayed normal a_K recovery probably results from the slowing of the rate of K^+ removal from the

extracellular space. Thus, it appears that the metabolically active Na^+, K^+ -pump is necessary to restore the normal extracellular a_{K} .

The slight decrease of a_{K} observed in response to high ejection current of distal K^+ in the glomerular layer might represent a local manifestation of the Na^+, K^+ -pump activation triggered by the loading of distal ejection site with exogenous K^+ . This could provide a mechanism by which the activation of the electrogenic pump might invade surrounding areas, e.g., via interglomerular connections.

It is of interest to note that the limitation of K^+ diffusion remains operative for large build-up K^+ in the glomerular extracellular space, and that only K^+ ejection currents higher than 800 nA, can lead to the breakdown of this process. Under these conditions the glial cells might increase in volume because of the high K^+ and water uptake [13]. This may have functional incidence on the glomerular activity and especially the activity of the mitral cell whose dendritic shaft emergence from the glomerulus is packed all along by glial cells [11].

This work was supported by a grant from the Medical Research Foundation (Lorraine committee).

- 1 Curtis, D.R., Perrin, D.D. and Watkins, J.C., The excitation of spinal neurones by the iontophoretic application of agents which chelate calcium, *J. Neurochem.*, 6 (1960) 1-20.
- 2 Freeman, W.J., Relation of glomerular neuronal activity to glomerular transmission attenuation, *Brain Res.*, 65 (1974) 91-107.
- 3 Halasz, N. and Shepherd, G.M., Neurochemistry of the vertebrate olfactory bulb, *Neuroscience*, 10 (1983) 579-619.
- 4 Henn, F.A., Haljamae, H. and Hamberger, A., Glial cell function: active control of extracellular K concentration, *Brain Res.*, 43 (1972) 437-443.
- 5 Jahr, C.E. and Nicoll, R.A., Primary afferent depolarization in the in vitro frog olfactory bulb, *J. Physiol. (Lond.)*, 318 (1981) 375-384.
- 6 Levetau, J. and Macleod, P., La discrimination des odeurs par les glomerules olfactifs du lapin: etude electrophysiologique, *J. Physiol. (Paris)*, 58 (1966) 717-729.
- 7 Lux, H.D., Fast recording ion specific microelectrodes: their use in pharmacological studies in the CNS, *Neuropharmacology*, 13 (1974) 509-517.
- 8 Martinez, D.P. and Freeman, W.J., Periglomerular cell action on mitral cells in olfactory bulb shown by current density analysis, *Brain Res.*, 308 (1984) 223-233.
- 9 Nicholson, C., Phillips, J.M. and Gardner-Medwin, A.R., Diffusion from an iontophoretic point source in the brain: role of tortuosity and volume fraction, *Brain Res.*, 169 (1979) 580-584.
- 10 Orkand, R.K., Nicholls, J.G. and Kuffler, S.W., Effect of nerve impulses on the membrane potential of glial cells in the central nervous system, of amphibia, *J. Neurophysiol.*, 29 (1966) 788-806.
- 11 Pinching, A.J. and Powell, T.P.S., The neuron types of the glomerular layer of the olfactory bulb, *J. Cell. Sci.*, 9 (1971) 305-345.
- 12 Reese, T.S. and Brightman, M.W., Olfactory surface and central olfactory connections in some vertebrates. In G.E.W. Wolstenholme and J. Knight, (Eds.), *Taste and Smell in Vertebrates*, Ciba Found. Symp., Churchill, London, 1970, pp. 115-149.
- 13 Ritchie, T., Packey, D.J., Trachtenberg, M.C. and Haber, B., K-induced ion and water movements in the frog spinal cord and filum terminale, *Exp. Neurol.*, 71 (1981) 356-369.
- 14 Sykova, E., Extracellular K accumulation in the spinal cord, In E. Sykova, P. Hink and L. Vyklycky (Eds.), *Ion-selective microelectrodes and their use in excitable tissues*, Plenum, New York, 1981, pp. 139-158.
- 15 Sykova, E., Extracellular K accumulation in the central nervous system, *Prog. Biophys. Mol. Biol.*, 42 (1983) 135-189.
- 16 Trachtenberg, M.C. and Pollen, D.A., Neuroglia: biophysical properties and physiological function, *Science*, 167 (1969) 1248-1252.

BRES 23979

Na⁺,K⁺-ATPase in the rat olfactory bulb: evidence for a higher enzymatic activity in the glomerular layer

A. Khayari, A. Mesfioui, F. Math and J.L. Davrainville

Laboratoire de Physiologie Générale II, Université de Nancy-I, Vandoeuvre-les-Nancy (France)

(Accepted 7 November 1989)

Key words: Na⁺, K⁺-ATPase; Protein content; Olfactory bulb; Rat

Protein content and ATPase activities have been determined in the superficial and deep layers of the rat olfactory bulb. Protein levels, Mg²⁺-ATPase and Na⁺,K⁺-ATPase activities were significantly higher in the whole homogenate of the superficial layers. These differences were amplified when activity was expressed on a wet weight basis in a crude microsomal preparation isolated by differential centrifugation. Specific activities, however, showed similar values in the microsomal fractions from superficial and deep layers. The results are discussed in terms of differences in the density of neuronal processes and efficiency of K⁺ reuptake mechanisms.

The K⁺ leaking out from active neurones changes the ionic composition of the extracellular fluid and therefore affects the function of neighbouring cells. To prevent functional impairment which can be caused by long-lasting accumulation of K⁺, Na⁺,K⁺-pumps provide an active transport mechanism to remove excess K⁺ from the extracellular space.

In a previous paper⁶, we provided evidence for the existence in the olfactory bulb glomerular layer, of a ouabain-sensitive mechanism preventing the spread of distally ejected K⁺. Extracellular accumulation of K⁺ has been associated with Na⁺,K⁺-ATPase activity¹⁵. Attempts to localize the Na⁺,K⁺-ATPase in nervous tissue¹⁴ have demonstrated a non-uniform distribution of the enzyme. The highest activity is found in layers with a high neurone/glia cell ratio, most of the activity being associated with cell processes⁷. However, glial cells do have a noticeable Na⁺,K⁺-ATPase activity² and have also been involved in the control of potassium transport in nervous tissue⁴.

The intraglomerular neuropil is composed of a dense accumulation of olfactory nerve terminals¹² and it seems possible that these neuronal elements contribute to the clearance of extracellular accumulated K⁺ to a higher extent than in the other bulbar layers.

The present study aims to link the lack of lateral diffusion of iontophoretically applied K⁺ in the glomerular layer⁶ to the presence of a high Na⁺,K⁺-ATPase activity.

Forty-day-old male Wistar rats weighing about 120 g

were used. After decapitation, the forebrain, including both olfactory bulbs, was quickly removed and stored at -18 °C (slow freezing) for 30 min to make tissue slicing easier. The dissection was made free hand under a stereomicroscope. Superficial layers of both olfactory bulbs, corresponding to the olfactory nerve and glomerular layers, were separated using a laboratory-made tissue slicer formed by two parallel blades mounted on a cooled holder. The superficial blade was blunt and rested on the olfactory bulb surface; it prevented the sharpened deep blade to penetrate deeper than 250–300 μm into bulbar tissues. The slices were thus 250–300 μm thick. The tissues obtained from 6 animals (about 50 mg wet wt. tissue, representing the superficial fraction) were homogenized in 4 ml sucrose solution (0.25 M) using a glass homogenizer with a Teflon pestle (type AA, clearance 80–100 μm), immersed in ice at 1000 r.p.m., and using 10 complete strokes. A 100 mg wet wt. sample of the underlying bulbar tissues (deep layers) was homogenized separately in 8 ml sucrose solution. Both constituted the whole homogenate preparation.

Microsomal fractions were prepared from 80 mg superficial and 80 mg deep tissues. The tissues were homogenized in 4.5 ml sucrose solution and centrifuged at 12,500 g for 15 min. The supernatant was carefully collected while the sediment was resuspended in 4 ml sucrose solution and centrifuged again at 12,500 g for 15 min. The sediment thus obtained was discarded and the supernatant added to that of the first centrifugation and centrifuged at 100,000 g for 60 min. The supernatant fluid

Correspondence: F. Math, Laboratoire de Physiologie Générale II, Université de Nancy-I, B.P. 239, 54506 Vandoeuvre-Les-Nancy, Cedex, France.

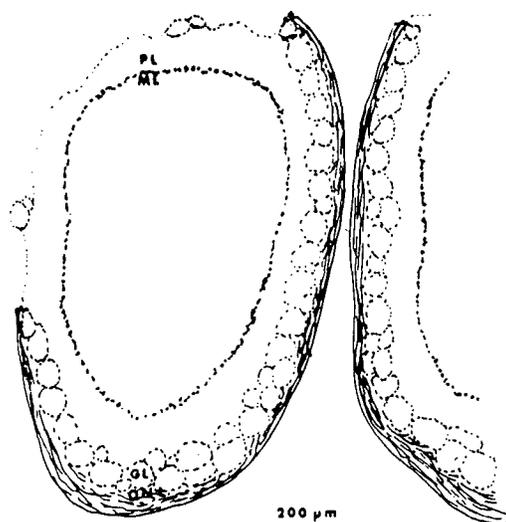


Fig. 1. Camera lucida drawing of a typical olfactory bulb slide obtained after using our slicing procedure. Only the dorsolateral surface of one olfactory bulb was removed in order to allow comparison. Superficial layer tissues can be sliced without important contamination from external plexiform layer tissues. ONL, olfactory nerve layer; GL, glomerular layer; PL, external plexiform layer; ML, mitral cell layer.

was then discarded and the sediment (vesicle-rich microsomal pellet containing membranous organelles) was diluted in 9 ml sucrose solution. This dilution allowed us to obtain a final protein concentration approaching that in the whole homogenate. In both cases (whole homogenate and microsomal fraction), the preparations were stored at -18°C for 24 h before biochemical evaluation of:

- protein content using the method of Lowry et al.⁸;
- Na^+, K^+ -ATPase and Mg^{2+} -ATPase activities by measuring, according to the Baginski method¹, the amount of P_i (inorganic orthophosphate) released in the incubation medium during a 15 min period at 37°C .

ATPase evaluation was performed as follows:

- tissue concentration of ATPase activity was assayed in an incubation medium containing 3 mM Mg^{2+} , 100 mM Na^+ , 30 mM K^+ , 100 mM Tris-HCl, pH 7.4 and 3 mM sodium-ATP (Boehringer);
- Mg -ATPase was assayed in K-free medium containing 3 mM Na-ATP, 3 mM Mg^{2+} , 130 mM Na^+ , 100 mM Tris-HCl, pH 7.4 and 1 mM ouabain. Although most procedures omit both Na^+ and K^+ , Na^+ is used in this medium in order to respect ionic strength. Ouabain is used to block Na^+, K^+ -ATPase activity;
- Na^+, K^+ -ATPase activity was calculated as the difference between the above activities.

Additional sliced olfactory bulbs were prepared (i.e. with olfactory nerve and glomerular layers partially removed) and cut into 50- μm -thick slices which were stained and used for histological controls. These controls

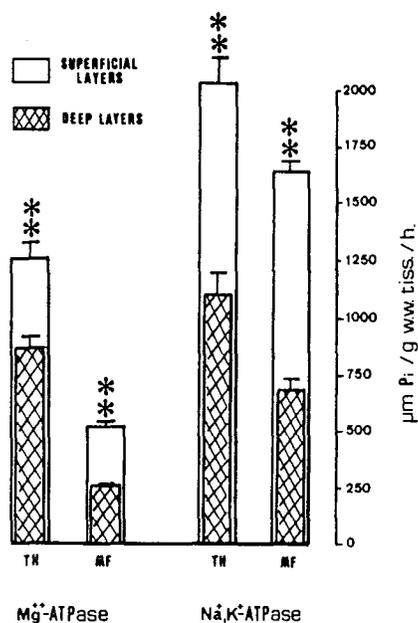


Fig. 2. Mg^{2+} - and Na^+, K^+ -ATPase tissue concentration of activity in superficial and deep layers of the rat olfactory bulb as measured in total homogenates (TH) and microsomal fractions (MF). Each pair of columns and the vertical bars represent the mean and the S.E.M. values of 3 determinations. Statistics were performed using Student's *t*-test; *, $P < 0.01$; **, $P < 0.001$.

showed that olfactory nerve and glomerular layers were accurately removed by our slicing procedure without significant contamination by the external plexiform layer (see Fig. 1).

Mg^{2+} - and Na^+, K^+ -ATPase tissue concentration of activity, expressed as $\mu\text{mol P}_i/\text{g}$ tissue per h, in the superficial and deep layers measured in the whole homogenate and the microsomal fraction are shown in Fig. 2. In the whole homogenate, Mg^{2+} and Na^+, K^+ -ATPase activities were higher in superficial than in deep layers by 54% and 85%, respectively. This difference was increased in the microsomal fractions: microsomal Na^+, K^+ -ATPase activity was significantly higher (+144%) in the superficial than in the deep layers and microsomes from the superficial layers contained 98% higher Mg^{2+} -ATPase activity than the deep layers.

Concerning the protein content, the superficial layers were found to contain more protein than the deep layers: 38% and 127% in whole homogenate and microsomal fraction, respectively (Fig. 3).

The differences in Mg^{2+} - and Na^+, K^+ -ATPase specific activities expressed as $\mu\text{mol P}_i/\text{mg}$ protein/h (Fig. 3) between the superficial and deep layers do not reach the magnitude observed in the differences between tissue concentration of the two enzymes. Na^+, K^+ -ATPase specific activity was, thus, slightly higher (34%) in superficial layers' whole homogenate but no statistically significant difference was seen in the microsomal prep-

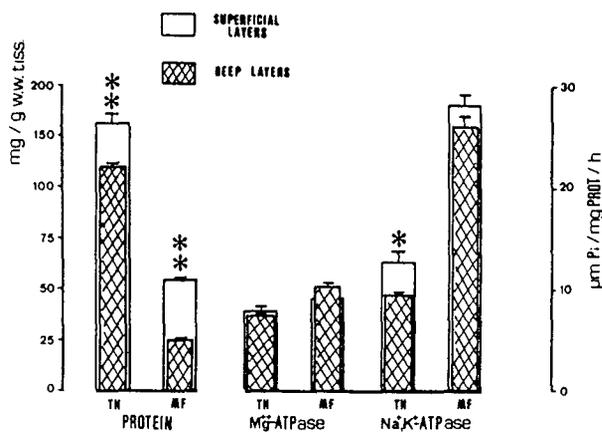


Fig. 3. Protein content, Mg^{2+} - and Na^+, K^+ -ATPase specific activities in total homogenate (TH) and microsomal fractions (MF) prepared from superficial and deep layers. Details of statistics are given in the legend of Fig. 2.

aration. Mg^{2+} -ATPase specific activity reached similar levels in all cases.

The main reason for making a comparison between the enzymatic activities measured in the different layers of the olfactory bulb was the expectation that some additional insights into regional enzyme distribution might explain the lack of diffusion of exogenous K^+ applied in the glomerular layer⁶. Clearance of K^+ from the extracellular space may involve passive and/or active processes which may be localized in both neurones and glia^{4,15}.

Our finding of differential ATPase activity in the different bulbar layers implies the existence of a direct relationship between the yield of enzyme activity and the dense accumulation of nerve terminals in the olfactory glomeruli^{11,12}. It is not surprising to find that Mg^{2+} - and Na^+, K^+ -ATPase tissue concentration of activity in whole homogenate, expressed as $\mu\text{mol P}_i/\text{g}$ tissue, was significantly higher in superficial layers. By contrast, Mg^{2+} - and Na^+, K^+ -ATPase specific activities in microsomal fractions expressed as $\mu\text{mol P}_i/\text{mg}$ protein, were almost the same in deep and superficial layers of the olfactory bulb. An Na^+, K^+ -ATPase activity of $28 \mu\text{mol P}_i/\text{mg}$ protein, similar to ours, was previously reported in whole homogenate of this structure⁹.

The protein content was significantly higher in the superficial layer fraction indicating possibly a higher

membrane content. Therefore, the lack of differences between the specific activities in superficial and deep layer fraction suggests that the differential enzyme activity observed in whole homogenates might be related rather to the abundance of membranes in cellular processes than to a higher density of the enzymes in specific membranes. Furthermore, the high activity of Mg^{2+} -ATPase in the superficial layers suggests an abundance of intracellular membranes, as well as the synaptic and plasma membranes containing Na^+, K^+ -ATPase. In the rat cortex, Mg^{2+} -ATPase distribution was found to outline the distribution of mitochondria while the intralaminar distribution of Na^+, K^+ -ATPase outlines that of plasma membranes where peaks of enzyme activity lie at subplial levels occupied by plexuses of fine dendrites and axons⁷.

The finding that the rate of protein synthesis is markedly higher in nerve cells than in glia² comforts the idea that the glomerular neuronal networks are responsible for the active reabsorption of K^+ . Nevertheless, glial sheets enclosing glomeruli and olfactory nerve bundles¹², might also be involved in K^+ reuptake.

Though the specific cell membrane sites which contain the enzymes have not been identified, our results give evidence for a spatial distribution of Mg^{2+} - and Na^+, K^+ -ATPase activity among bulbar layers. This distribution coincides with the anatomical data^{5,11,12} demonstrating a high amount of neuronal terminals in the glomerular layer. In the somatosensory cortex, a similar distribution was reported^{7,13,14}. Thus, areas containing a large number of synapses showed peaks of Na^+, K^+ -ATPase activity which seemed to reside primarily in neuronal processes³ and especially in synaptosomes¹³. In the olfactory bulb a direct relationship of lowered Na^+, K^+ -ATPase activity and reductions in the development of membranes and synapses by olfactory bulb deafferentation was addressed¹⁰.

A subsequent detailed examination of the nature of membranes recovered in the microsomal fraction is necessary to enable us to characterize the subcellular distribution of Mg^{2+} - and Na^+, K^+ -ATPase.

This work was supported by a grant from the Medical Research Foundation (Lorraine Committee).

- 1 Baginski, E.S., Foa, P.P. and Zak, B., Determination of phosphate: study of labile organic phosphate interference. *Clin. Chim. Acta*, 15 (1967) 155-158.
- 2 Bloomstrand, C. and Hamberger, A., Amino acid incorporation in vitro in proteins of neuronal and glial cell enriched fractions. *J. Neurochem.*, 17 (1970) 1187-1195.
- 3 Broderson, S.H., Paton, D.I. and Stahl, W.L., Fine structural localization of potassium-stimulated *p*-nitrophenylphosphatase activity in dendrites of the cerebral cortex. *J. Cell. Biol.*, 77 (1978) R13-R17.

- 4 Cordingley, G.E. and Somjen, G.G., The clearing of excess potassium from extracellular space in spinal cord and cerebral cortex. *Brain Research*, 151 (1978) 291-306.
- 5 Halasz, N. and Shepherd, G.M., Neurochemistry of the vertebrate olfactory bulb. *Neuroscience*, 10 (1983) 579-619.
- 6 Khayari, A., Math, F. and Davrainville, J.L., Evidence for an absence of K^+ spread in the glomerular layer of the rat olfactory bulb. *Neurosci. Lett.*, 93 (1988) 56-60.
- 7 Lewin, E. and Hess, H.H., Intralaminar distribution of Na^+, K^+ -adenosine triphosphatase in rat cortex. *J. Neurochem.*, 11

- (1964) 473-481.
- 8 Lowry, O.H., Rosenbrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J., Protein measurement with the Folin phenol reagent, *J. Biol. Chem.*, 193 (1951) 265-275.
 - 9 Meisami, E. and Mousavi, R., Lasting effects of early olfactory deprivation on growth, DNA, RNA and protein content and Na^+, K^+ -ATPase and AChE activity of the rat olfactory bulb, *Dev. Brain Research*, 2 (1982) 217-229.
 - 10 Meisami, E. and Manoochehri, S., Effects of early bilateral chemical destruction of olfactory receptors on postnatal growth, Mg^{2+} -ATPase and Na^+, K^+ -ATPase activity of olfactory and non-olfactory structures of the rat brain, *Brain Research*, 128 (1977) 170-175.
 - 11 Pinching, A.J. and Powell, T.P.S., The neuropil of the glomeruli of the olfactory bulb, *J. Cell. Sci.*, 9 (1971) 347-377.
 - 12 Shepherd, G.M., Synaptic organization of the mammalian olfactory bulb, *Physiol. Rev.*, 52 (1972) 864-917.
 - 13 Stahl, W.L., The Na^+, K^+ -ATPase of nervous tissues, *Neurochem. Int.*, 8 (1986) 449-476.
 - 14 Stahl, W.L. and Broderson, S.H., Localization of Na^+, K^+ -ATPase in brain, *Fed. Proc.*, 35 (1976) 1260-1285.
 - 15 Sykova, E., Extracellular K^+ accumulation in the central nervous system, *Prog. Biophys. Mol. Biol.*, 42 (1983) 135-189.

BRE 23128

Influence of GABA, baclofen and bicuculline on the extracellular K⁺ activity in the olfactory bulb of the developing rat

F. Math, A. Khayari and J.L. Davrainville

Laboratoire de Physiologie Générale II, Université de Nancy-I, Vandoeuvre-les-Nancy (France)

(Accepted 21 June 1988)

Key words: Development; Olfactory bulb; Potassium ion; γ -Aminobutyric acid receptor

γ -Aminobutyric acid (GABA) and baclofen were iontophoresed into the glomerular and plexiform layers of the olfactory bulb of rats at different ages. Subsequent changes in K⁺ activity and mitral cell firing rates were monitored to specify GABA receptor activation. Only bicuculline-insensitive receptors are shown to be already present in the glomerular layer of the newborn rat. The possible distribution and maturation of GABA receptors on the olfactory nerve endings or on the dendrites of the mitral or periglomerular cells is discussed.

The presence and the role of γ -aminobutyric acid (GABA) were largely brought to light in the olfactory bulb^{1,7,11}. However, ontogenetic evolution of GABAergic inhibition is not so well documented^{3,12}.

We have provided evidence, in a previous paper¹⁴, for a precocious inhibitory effect of GABA on mitral cell firing which was related to extracellular ionic composition. Iontophoresis of GABA was found to cause an increase in membrane conductance⁷. The best established action of GABA at the receptor sites is the opening of Cl⁻-conductance channels^{5,18}, this inhibitory effect of GABA being selectively blocked by bicuculline⁹. Another response to GABA is mimicked by baclofen, a GABA agonist at the GABA_B receptor. In this case, receptor activation, which is bicuculline-resistant, modulates Ca²⁺ and K⁺ conductances⁹.

Accordingly we used K⁺-sensitive micropipettes to monitor K⁺ transients in response to iontophoresed GABA and baclofen in order to specify the nature of GABA responses observed in the olfactory bulb. On the other hand, we used mitral cells firing rate and responses to bicuculline to specify bicuculline-sensitive responses to GABA.

In the olfactory cortex, GABA_B receptors were described as being presumably presynaptic². Furthermore, the coexistence of the two recognition sites was reported in the dorsal root ganglion primary afferents⁴. GABAergic associative cells are very rare at birth in the olfactory bulb¹². Our goal is to give evidence for a new aspect of their progressive influence on glomerular transmission.

Experiments were performed on Wistar rats at the following ages: 24, 48 h and 7, 21 and 35 days postnatally. They were anesthetized with equithesin (0.3 ml/100 g b.wt.) and immobilized with gallamine triethiodide (10 mg/100 g) before being tracheotomized and artificially ventilated. The animals were then placed in a stereotaxic apparatus modified for immobilizing young rats. Potassium-sensitive microelectrodes (KSM) were made according to Lux's method¹³ and calibrated (slope: 52 mV/10-fold rise of K⁺). The KSM was coupled to a reference (NaCl-containing) electrode and to a 3-barrel tubing used for iontophoresis. This latter contained saline solutions of GABA (0.5 M, pH 4.0, Sigma), bicuculline (5 mM, pH 3.0, Sigma) and baclofen (10 mM, pH 3.0, Ciba-Geigy). The tips of KSM and iontophoresis tubing were sepa-

Correspondence: F. Math, Laboratoire de Physiologie Générale II, Université de Nancy-I, B.P. 239, 54506 Vandoeuvre-les-Nancy, Cedex, France.

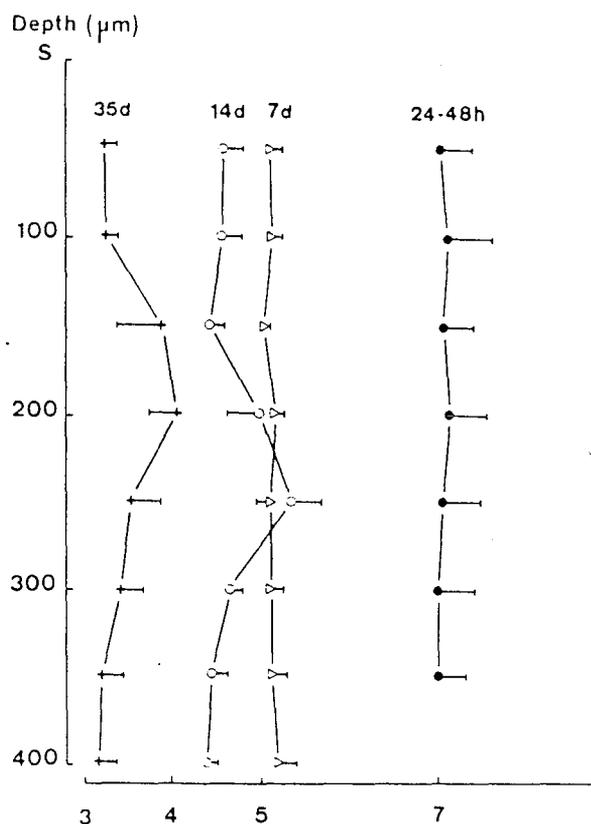


Fig. 1. Variations of the extracellular K⁺ activity (a_K in mM) in the olfactory bulbs of rats at different ages: 24–48 h (●), 7 days (△), 14 days (○) and 35 days (+). Each point represents mean (\pm S.D.) on 35 tests at each age. The depths are evaluated from olfactory bulb surface (level 0).

rated by 6–10 μm .

Extracellular potential monitoring was made with a high impedance preamplifier (Grass, HIP16) coupled to a reference electrode which was thrust in the olfactory bulb.

In young pups (until the 7th postnatal day (PN 7)), the resting a_K level varies between 7.0 ± 0.4 and 5.1 ± 0.1 mM ($n = 35$ animals). These values remain constant whatever the KSM depth (Fig. 1). During the 2 d PN week, we measured a resting a_K of 4.4 ± 0.2 mM ($n = 35$) but between 150 and 250 μm of depth, it rose to 5.3 ± 0.3 mM. Similar variations were observed in 21–35-day-old rats. The a_K level is stabilized at 3.3 ± 0.2 mM ($n = 35$) and higher values of 4.0 ± 0.1 mM were measured between 150 and 250 μm , an area which histologically corresponds to the glomerular layer.

In pups less than 48-h old, GABA application (100

nA) in the superficial layers simultaneously decreased the rate of mitral cell firing from 5 to 3.5 spikes/s (Fig. 2A) and increased a_K by 1.3 ± 0.2 mM ($n = 25$). These GABA effects were not reversed by bicuculline (60 nA), but they were mimicked by baclofen ejection (100 nA). At this level, bicuculline ejection alone failed to induce any increase in a_K or in the field potential rate (Fig. 2A).

When the KSM depth was 100 μm (Fig. 2B), bicuculline ejection not only antagonized GABA depressive action, but it also increased the firing rate from 3.8 to 5.0 spikes/s which produced a larger a_K rise (2.0 ± 0.2 vs 1.2 ± 0.3 mM with GABA alone). Even though baclofen induced a GABA-like effect, its action on firing rate was delayed in comparison with the response noted in the glomerular layer.

In 7–35-day-old rats, GABA effects, bicuculline antagonism and baclofen agonism were not significantly different according to the KSM location (Fig. 2C and D). Bicuculline clearly reversed GABA action since extracellular potential discharge inhibition ceased during simultaneous GABA and bicuculline application. Furthermore the firing rate was enhanced (up to 25 spikes/s) which, in turn, produced a larger increase in a_K (2.7 ± 0.5 vs 1.3 ± 0.2 mM for GABA alone).

As far as the present results can be correlated with ontogenetic maturation of GABAergic inhibition in the olfactory bulb, we can presume that this latter undergoes important changes during the early postnatal period. We have noted that GABAergic inhibition was already present in the newborn¹⁴, but it was resistant to bicuculline at the glomerular level. Nevertheless, in the deeper layers, the increases in a_K were particularly enhanced in the presence of bicuculline. This might be related to the blockade of inhibitory potentials¹⁶ and to the enhancement of the firing rate which in turn produces larger K⁺ transients. Bicuculline application did not reverse GABA effects nor induce any change in a_K at the glomerular level of 24- and 48-h-old rats. From this, it can be suggested that GABA receptors, which might be activated either by GABA or baclofen, are bicuculline-resistant⁹ at olfactory nerve endings of the newborn olfactory bulb.

The expected antagonism by bicuculline, which increases the field potentials⁸ and the K⁺ signals, appeared in the plexiform layer of the newborn and in all the layers in older animals. These results favour

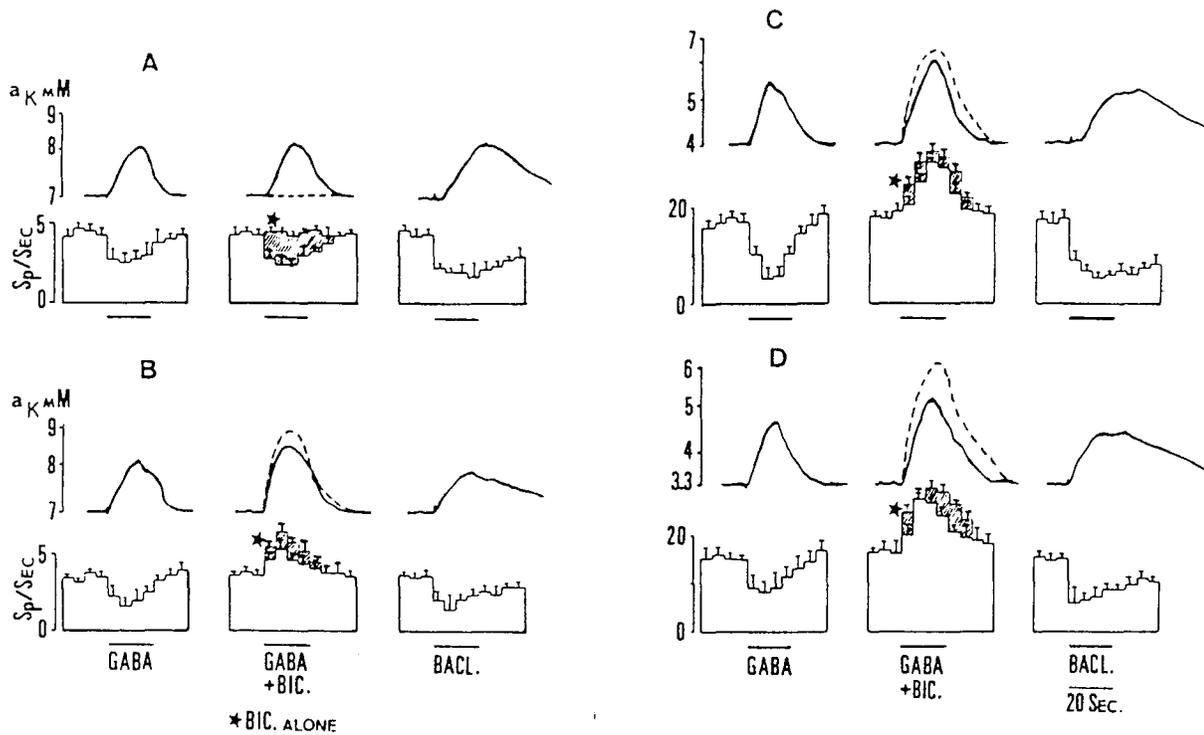


Fig. 2. Extracellular K^+ shifts and frequency distribution histograms of the extracellular action potentials of mitral cells in response to iontophoretic applications of GABA (100 nA), bicuculline (60 nA) and baclofen (100 nA). Left panels show the responses observed in 24–48-h-old pups at the glomerular level (A) and in the plexiform layer (B) ($n = 25$). Right panels show the responses obtained in 35-day-old animals ($n = 33$) in the glomerular layer (C) and in the plexiform layer (D). Hatched columns and broken lines represent the effect of bicuculline alone. Each bar represents the mean (\pm S.D.) frequency during a 5-s period. Extracellular K^+ signals are those obtained from a typical experiment (original traces retouched).

the hypothesis that a spatial distribution of GABAergic inhibition in relation with GABA receptor species might exist in the developing olfactory bulb. Thereafter, the GABAergic inhibitory system prevailing at the olfactory bulb entry seems to be baclofen-dependent in pups less than 48-h-old.

This is consistent with a recent report¹⁷ which concluded that olfactory nerve terminals bear baclofen-dependent receptors, and other observations^{5,6} suggesting a presynaptic localization of these receptors. On the other hand, the slow time course and sus-

tained influence of baclofen which was noted had been also observed in the hippocampus slice¹⁵. Such effect results from a low uptake of baclofen by the nervous tissues.

This work was supported by a Grant from the Medical Research Foundation. We are grateful to Professor A. Hölléy for his criticisms in the course of this work. We also thank Mrs C. Math for her technical assistance.

- 1 Austin, L., Recasens, M. and Mandel, P., GABA in the olfactory bulb. *J. Neurochem.*, 32 (1979) 1473–1477.
- 2 Collins, C.G.S., Anson, J. and Kelly, E.P., Baclofen: effects on evoked field potentials and aminoacid neurotransmitter release in rat olfactory cortex slice. *Brain Research*, 238 (1982) 371–383.
- 3 Corrigan, W.A., Crain, S.M. and Bornstein, M.B., Electrophysiological studies of fetal mouse olfactory bulb explants during development of synaptic functions in culture.

- 4 Desarmenien, M., Feltz, P., Occhipinti, G., Santangelo, F. and Schlichter, R., Coexistence of GABA_A and GABA_B receptors on Ad and C primary afferents. *Br. J. Pharmacol.*, 81 (1984) 327–333.
- 5 Deschenes, M. and Feltz, P., GABA-induced rise of extracellular potassium in dorsal root ganglia: an electrophysiological study in vivo. *Brain Research*, 118 (1976) 494–499.
- 6 Dunlap, K. and Fischbach, G.D., Neurotransmitters de-

- crease the calcium conductance activated by depolarization of embryonic chick sensory neurons. *J. Physiol. (Lond.)*, 317 (1981) 519-535.
- 7 Halasz, N. and Shepherd, G.M., Neurochemistry of the vertebrate olfactory bulb. *Neuroscience*, 10 (1983) 579-619.
 - 8 Hamon, B. and Heinemann, U., Effects of GABA and bicuculline on *N*-methyl-D-aspartate and quisqualate-induced reductions in extracellular free calcium in area CA1 of the hippocampal slice. *Exp. Brain Res.*, 64 (1986) 27-36.
 - 9 Hill, D.R. and Bowery, N.G., ³H-baclofen and ³H-GABA bind to bicuculline insensitive GABA_B sites in rat brain. *Nature (Lond.)*, 290 (1981) 149-152.
 - 10 Iversen, L.L., Amino acids and peptides: fast and slow chemical signals in the nervous system. *Proc. R. Soc. Lond. Ser.*, 221 (1984) 245-260.
 - 11 Jaffe, E.H. and Cuello, A.C., Neuronal and glial release of ³H-GABA from the rat olfactory bulb. *J. Neurochem.*, 37 (1981) 1457-1466.
 - 12 Kosaka, K., Hama, K., Nagatsu, I., Wu, J.Y., Otterson, O.P., Storm-Mathisen, J. and Kosaka, T., Postnatal development of neurons containing both catecholaminergic and GABAergic traits in the rat main olfactory bulb. *Brain Research*, 403 (1987) 355-360.
 - 13 Lux, H.D., Fast recording ion specific microelectrodes: their use in pharmacological studies in the central nervous system. *Neuropharmacology*, 13 (1974) 509-517.
 - 14 Math, F. and Davrainville, J.L., Effects of GABA and aspartate at the dendrodendritic synapses in the developing rat olfactory bulb. *Neurosci. Lett.*, 14 (1983) Suppl. 240.
 - 15 Newberry, N.R. and Nicoll, R.A., Direct hyperpolarizing action of baclofen on hippocampal pyramidal cells. *Nature (Lond.)*, 308 (1984) 450-452.
 - 16 Nowycky, M.C., Mori, K. and Shepherd, G.M., GABAergic mechanisms of dendrodendritic synapses in isolated turtle olfactory bulb. *J. Physiol. (Lond.)*, 46 (1981) 639-648.
 - 17 Potapov, A.A., Baclofen inhibition of synaptic transmission in frog olfactory bulb glomeruli. *Neurophysiology*, 17 (1985) 834-837.
 - 18 Sykova, E., Extracellular K⁺ accumulation in the central nervous system. *Prog. Biophys. Molec. Biol.*, 42 (1983) 135-189.



NOM DE L'ETUDIANT : KHAYARI Abdelmajid

NATURE DE LA THESE : Doctorat de l'Université de NANCY I en Neurosciences

VU, APPROUVE ET PERMIS D'IMPRIMER

NANCY, le 20 MARS 1990 n° 617

LE PRESIDENT DE L'UNIVERSITE DE NANCY I



RESUME:

Basés sur l'enregistrement des fluctuations du métabolisme minéral dans le système olfactif, les résultats rapportés dans cette thèse traitent de l'implication fonctionnelle des flux ioniques dans la perception olfactive.

Dans la première partie, nous montrons que le phénomène de transduction dont le siège est la muqueuse nasale, s'accompagne d'importants changements des activités potassique et calcique extracellulaires. Nos résultats indiquent une implication directe des ions Ca dans la genèse de l'électroolfactogramme chez la grenouille.

Dans la deuxième partie, nous apportons une contribution originale à l'étude du codage bulbaire des informations olfactives en démontrant que l'accumulation extracellulaire de K est impliquée dans le processus de compression dynamique des signaux afférents au niveau des glomérules olfactifs du rat. La localisation intraglomérulaire de ce phénomène est étayée par d'autres données mettant en évidence l'absence de diffusion de K exogène et l'existence d'une importante concentration tissulaire de l'activité Na,K-ATPase au niveau glomérulaire. En outre, nous démontrons, à travers l'étude ontogénétique de la maturation de l'inhibition GABAergique, que les récepteurs portés par les terminaisons nerveuses glomérulaires sont de type GABA_B chez le rat nouveau-né.